

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**IMMUNOPHÄNOTYPISIERUNG DES
ENTZÜNDLICHEN INFILTRATES
DER ARTHROSE ASSOZIIERTEN
SYNOVIALITIS**

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Gerhard Ristow
aus Gießen

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med V. Krenn
 2. Dr. med. Dr. phil. J. Kriegsmann
 3. Dr. P. Stiehl

eingereicht: 26. Juli 2002

Datum der Promotion: 07. April 2003

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1	Klinische Definition der Arthrose	1
1.2	Epidemiologie	1
1.3	Pathogenese	1
1.4	Das Gelenk und seine Entzündungsreaktionen	2
1.4.1	Histologischer Aufbau eines Gelenks	2
1.4.2	Histopathologie der Synovialitis	3
1.4.3	Die Synovialitis der Arthrose	3
1.5	Zielsetzung der Arbeit	6
2.	Material und Methoden	9
2.1	Patienten und Gewebe	9
2.2	Aufarbeitung des Gewebes	9
2.2.1	Aufarbeitung des Gewebes für Kryostatschnitte (Immunhistochemie)	9
2.2.2	Aufarbeitung des Gewebes für Paraffinschnitte (Immunhistochemie)	9
2.3	Immunhistochemie	10
2.3.1	Indirekte Immunperoxidase Technik (iIP)	10
2.3.2	Indirekte Immunperoxidase Technik zum Cytokin Nachweis	11
2.3.3	Indirekte Immunofluoreszenz (iIFL)	11
2.4	Auswertung der Übersichtspräparate	12
2.5	Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen	12
2.6	Statistische Analyse	12

2.7	Fotodokumentation	12
2.8	Reagenzien	13
2.9	Apparate	13
2.10	Tabellen	14
3.	Ergebnisse	17
3.1	Expression des B-Zell assoziierten Antigens CD 20 (Kryomaterial)	17
3.2	Bestimmung der IgG, IgA und IgM Isotypen der Plasmazellen (Paraffin- und Kryomaterial)	17
3.3	Expression von Makrophagenantigenen (Kryomaterial)	18
3.4	Expression der T-Zell Antigenen CD 4 und CD 8 (Kryomaterial)	18
3.5	Gegenüberstellung der Expression von CD 4 und IL-2 (Kryomaterial)	19
3.6	Gegenüberstellung der Expression von CD 4 und IL-10 (Kryomaterial)	19
3.7	Expression von Cytokinen (IL-2 und IL-10)	20
3.8	Expression von Ki-67 (Kryomaterial)	20
3.9	Tabellen	21
4.	Diskussion	29
4.1	Pathogenese der Arthrose	29
4.2	Die Synovialitis der Arthrose	30
4.2.1	Detritussynovialitis	31
4.2.2	Lymphoplasmazellulärer Synovialitis (LPS)	31
4.3	Immunologische Charakterisierung des entzündlichen Infiltrates der Arthrose	31
4.3.1	Lymphozyten der lymphoplasmazellulären Synovilitis	32

4.3.2	Isotypen der Plasmazellen	32
4.3.3	Synoviale oder extrasynoviale Maturation ?	33
4.4	Die Rolle von Cytokinen in der OA	35
4.5	Subtypen der T-Helferzellen und ihre Bedeutung für das entzündliche Infiltrat bei Arthrose	36
4.5.1	Differenzierung der T-Helferzellen anhand der Zytokinmuster	37
4.5.2	Gibt es eine dominierende T _H Antwort bei Arthrose?	39
4.6	Perspektiven	40
5.	Zusammenfassung	43
6.	Summary	45
7.	Abbildungen	47
8.	Literatur	51
9.	Anhang	63
	Tabellenübersicht	63
	Abbildungsübersicht	64
	Danksagung	65
	Curriculum vitae	67

Abkürzungen

AaS	Arthrose assoziierte Synovialitis
CD	Cluster of differentiation
FDCs	follikulär-dendritischen Zellen
gc	germinal center
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HE	Hämalaun Eosin Färbung
IFN	Interferon
IFS	Inflammatory Score
IFT	indirekte Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IGF	insulin-like growth factor
IgVH	Immunglobulin Variable Heavy Chain
IIFL	indirekte Immunfluoreszenz Technik
iIP	indirekte Immunperoxidase Technik
IL	Interleukin
IL-10	Interleukin-10
IL-2	Interleukin-2
LT	Lymphotoxin
mAk	monokloner Antikörper
MHC	major histocompatibility complex
NK	natürlichen Killerzellen
PBS	Phosphat Buffer Solution (Pufferlösung)

TGF	Transforming growth factor
T _H	T-Helferzelle CD4+ T-Lymphozyt
TNF	Tumornekrosefaktor

1. Einleitung

1.1 Klinische Definition der Arthrose

Bei der Arthrose (syn. Arthrosis deformans, im englischen Sprachraum Osteoarthritis) handelt es sich nach allgemeiner Lehrmeinung um eine degenerative Gelenkerkrankung, die mit einer zunehmenden Läsion des Knorpels bis hin zu seinem Verlust einher geht (Cooke 1985, Sulzbacher 2000). Sie kann sich an jedem Gelenk manifestieren. Die bekanntesten Manifestationen sind Knie- und Hüftgelenke, Fingerendgelenke (Heberdensche Arthrose), Fingermittelgelenke (Bouchard-Arthrose), sowie im Bereich der Wirbelsäule als sogenannte Spondylarthrosen (Remmele 1997).

1.2 Epidemiologie

Die Einschätzung von Inzidenz und Prävalenz von Gon- oder Coxarthrose variiert erheblich. Je nach Studie beträgt die Inzidenz zwischen 10 bis 2230 pro 10 Personen - Jahren, die Prävalenz wird auf 0,5 bis 36% eingeschätzt (Sun *et al.* 1997, Hoaglund & Steinbach 2001). Allgemein kann man jedoch sagen, dass Frauen über 50 Jahren ein stärkeres Risiko haben, an einer Arthrose zu erkranken. Außerdem ist bei Männern radiologisch häufiger eine Hüftarthrose, bei Frauen aber die Arthrose des Knies nachweisbar. (Remmele 1997).

1.3 Pathogenese

Die Pathogenese der Arthrose ist in ihrer komplexen Gesamtheit noch nicht geklärt. Es existieren zwei Pathogenesekonzepte nebeneinander (Mohr 2000b). In dem biochemischen Konzept wird davon ausgegangen, dass durch einen unbekannten, vielleicht entzündlichen Reiz, es zu einer Destruktion von Knorpelmatrix kommt. Da die Ursache für diese Reaktion unbekannt ist, werden diese Arthrosen auch als ideopathische oder auch primäre Arthrosen bezeichnet (Remmele 1997, Hoaglund & Steinbach 2001). Aigner konnte nachweisen, dass in frühen Stadien eine hohe Fibronectinproduktion stattfindet. Die Kollagentypen II und VI werden vermehrt gebildet, einzelne Metallproteinasen dafür je nach Erkrankungsstadium. (Aigner *et al.* 2001). Reaktiv werden vermehrt Proteinasen und Kollagen von den Chondrozyten produziert, die sich dabei phänotypisch verändern (Aigner *et al.* 2002). Im

biomechanischen Konzept wird davon ausgegangen, dass zu Beginn der Erkrankung ein Mißverhältnis zwischen Belastung und Belastbarkeit des Gelenkknorpels steht (Felsen *et al.* 1994; Vingård *et al.* 1991). Aufgrund der hohen Belastung kommt es zu einem Proteoglykanverlust des Knorpels.

Beide Konzepte führen zu einer Verminderung der Knorpel elastizität. Der Verlust an Proteoglykanen bewirkt, dass weniger Wasser im Knorpel gebunden werden kann. Dadurch kommt es zu Belastungserscheinungen in Form von Ermüdungsbrüchen der kollagenen Fasern. Im weiteren Verlauf führt dies wiederum zum Verlust des Knorpels an den korrespondierenden Gelenkflächen und Rissen im Grenzbereich zwischen nicht verkalktem und verkalktem Knorpel (Radin *et al.* 1991). Es kommt zur Destruktion der Gelenkstrukturen, beginnend beim Knorpel und endend beim Knochen. Im Rahmen dieser degenerativen Prozesse werden weitere Prozesse angestoßen: Bildung von Osteophyten, Pseudonekrosen (Rhaney & Lamb *et al.* 1955) und eine - im Vergleich zur rheumatoiden Arthritis - eher geringgradige entzündliche Reaktion der Synovialmembran (Krenn *et al.* 1999b).

1.4 Das Gelenk und seine Entzündungsreaktionen

1.4.1 Histologischer Aufbau eines Gelenks

Die Gelenkkapsel bestehend aus einer äusseren Schicht, dem *Stratum fibrosum* und einer inneren, dem *Stratum synoviale*, welche die Synovialflüssigkeit produziert.

- Das Stratum fibrosum besteht aus straffem kollagenem Bindegewebe, dass unterschiedliche Schichtdicken aufweist und über zahlreiche Nervenfasern und Gefäße verfügt.
- Das Stratum synoviale (synonym Membrana synovialis) besteht aus lockerem Bindegewebe, dass reichlich Zellen, nämlich Fibroblasten, Fibrozyten und Adipozyten enthält. Es ist gut vaskularisiert durch fenestrierte Kapillaren und mit freien sowie enkapsulierten Nervenendigungen versehen (Zimny 1988, Krenn *et al.* 1990). Die Deckzellschicht wird in zwei verschiedene Zellarten unterschieden, (Barland und Novikoff 1962), die A- Zellen, die die Fähigkeit zur Phagozytose

haben und die B-Zellen, die Fibroblasten ähnlich erscheinen (Athanasou *et al.* 1995, Kriegsmann *et al.* 1995) und denen die Funktion zur Synthese der Synovia zugeschrieben wird.

Der *Gelenkknorpel* ist hyaliner Knorpel. Die in der Matrix enthaltenen Kollagenfaserbündel bilden an der Gelenkoberfläche tangential Faserschichten, so dass die dort auftretenden Scher- und Druckkräfte optimal verarbeitet werden. Bemerkenswert ist das Fehlen von Perichondrium zum Gelenkspalt hin, so dass dem Gelenkknorpel im Falle einer Läsion die Möglichkeit zur Reparation fehlt. (Sun *et al.* 1997)

1.4.2 Histopathologie der Synovialitis

Die Synovialitiden der Gelenke können unterschiedliche Ursachen haben. Je nach Ursache entwickelt sich daraus ein charakteristisches histopathologisches Bild (Mohr 2000 b). Die bakterielle Infektion zeichnet sich durch eine akute Reaktion mit granulozytärer Infiltration, ödematöser Schwellung, Gelenkerguss und evtl. Fibrinablagerungen aus. Bei den Kristallarthritiden kommen zusätzlich noch Fremdkörperriesenzellen und aktivierte Fibroblasten vor (Remmele 1997). In der rheumatoiden Arthritis (RA) kommt es im Rahmen einer Autoimmunreaktion zu einer heftigen entzündlichen Reaktion mit Infiltration des Gelenkes durch Lymphozyten und Makrophagen. In Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer zeichnet sich die Synovialitis der RA durch ein dichtes, zum Teil lymphofollikulär organisiertes entzündliches Infiltrat mit beträchtlich aktivierter Deckzellschicht, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und aktivierten synovialen Fibroblasten/Makrophagen sowie Granulomen aus (Stiehl 1997). Dabei konnte von Krenn gezeigt werden, dass bei der entzündlichen Reaktion der RA eine Reifung der B-Lymphozyten in Keimzentren vergleichbaren lymphofollikulären Aggregaten stattfindet (Krenn 1999b).

1.4.3 Die Synovialitis der Arthrose

Aufgrund der Pathogenese ist die Synovialitis der Arthrose als eine sekundäre und reaktive Entzündung der Synovialmembran zu betrachten, da zunächst ein Abbau von Knorpelfragmenten besteht (Fassbender *et al.* 1987). Diese Fragmente aus

degeneriertem Gelenkknorpel gelangen in die Membrana synovialis und führen dort im Rahmen des Abbaus zu einer entzündlichen Reaktionen. (Goldenberg *et al.* 1982)

In verschiedenen Arbeiten wurde die Morphologie des entzündlichen Infiltrates bereits charakterisiert (Altman 1995). Dabei werden zwei Unterformen aufgrund ihrer dominierenden Komponente unterschieden.

Die eine Unterform zeigt im histologischen Bild eine geringgradigen Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht und eine Zunahme des Bindegewebes vorrangig in der Nähe von Knorpelfragmenten. Aufgrund der Knorpelfragmente, die vom Gelenkknorpel stammen, wird diese Form als *Detritussynovialitis* bezeichnet.

Die andere Unterform weist vor allem perivaskulär gelegene leichte, lymphozytäre und plasmazelluläre Infiltrationen auf. (Cooper *et al.* 1981, Kennedy *et al.* 1988, Revell *et al.* 1988, Soren *et al.* 1988). Dies sind die Charakteristika der *Lymphoplasmazellulären Synovialitis*. Die im Vergleich zur rheumatoiden Arthritis geringgradigen lymphozytären Infiltrationen wurden als B-Lymphozyten sowie CD 4+ und CD 8+ T-Lymphozyten identifiziert (Kennedy *et al.* 1988).

Es ist ungeklärt in welcher Form und wo eine Reifung der Lymphozyten der Arthrose assoziierten Synovialitis (AaS) stattfindet. In der Regel erfolgen diese Prozesse der Reifung in einem primär immunkompetenten Organ, dem Lymphfollikel (Berek *et al.* 1997). Dort kommt es zu einer Aktivierung des unreifen B-Lymphozyten durch Antigenkontakt. Im weiteren Verlauf wird über CD 40 (B-Lymphozyt) und CD 40L (=CD154, T-Zelle) Interaktion eine B-Zell Proliferation induziert. Diese Zellen benötigen im nächsten Schritt den Kontakt mit follikulär-dentritischen Zellen (FDCs = antigenpräsentierende und immunmodulierende Zellen), um durch eine Hypermutation der IgVH/L-Gene eine Affinitätssteigerung zum Antigen zu erreichen. Diese wird durch Chemotaxis zwischen FDCs und B-Zelle erreicht. In einem abschließenden Schritt benötigt die so gereifte B-Zelle wiederum den Kontakt zu T-Helferzellen, um überleben zu können. Ohne diesen Kontakt kommt es zur Apoptose. Der ausgereifte B-Lymphozyt differenziert sich entweder zur Plasmazelle oder ruht als Gedächtniszelle bis zum

erneuten Antigenkontakt. Dieser Reifungsvorgang findet sein organisatorisches Korrelat im Lymphfollikel und zwar im Keimzentrum (engl.: germinal center), weshalb auch von Keimzentrums-Reaktion gesprochen wird. Eine lymphofollikuläre Organisation oder eine dem Keimzentrum entsprechende Reaktion ist bisher nur in wenigen Fällen beschrieben (Cooper *et al.* 1981, Ristow *et al.* 1999). Die B-Lymphozyten und Plasmazellen weisen jedoch hochmutierte VH-Gene auf (Krenn *et al.* 1999b).

Des Weiteren sind nur wenig Daten über den Subtyp der T-Zellantwort bei Arthrose vorhanden, lediglich das T-Zellinfiltrat wurde durch molekulare Methoden als ein polyklonales Infiltrat beschrieben (Zwillich *et al.* 1994, Sakkas *et al.* 1998). Ihre Rolle bei immunologischen Prozessen wird im allgemeinen nach Subtypen der CD 4+ T-Lymphozyten gegliedert und kann anhand der Cytokin Expression vorgenommen werden (Mosmann *et al.* 1986, Constant *et al.* 1997).

Die T_H1-Population kann durch die Sekretion der Cytokine γ -IFN, LT, TNF- β , Interleukin 2 (IL2) charakterisiert werden. Dabei bewirkt γ -IFN eine Aktivierung der Makrophagen mit verstärkter Expression von MHC I und MHC II sowie eine Differenzierung der IgG Subklasse in der B-Zelllinie. Auf die T-Zell-Population wirken die Cytokine γ -IFN, LT und TNF- β reduzierend, IL-2 dagegen bewirkt eine Zunahme der T-Zell-Population. Die B-Lymphozyten werden von LT und TNF- β , inhibiert, IL-2 bewirkt ein Wachstum der B-Lymphozyten und eine Differenzierung der J-Ketten (Trinchieri *et al.* 1996).

Die T_H2-Antwort kann durch die Expression der Cytokine Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 5 (IL-5), Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 10 (IL-10) charakterisiert werden. IL-4 fördert die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen (Breedveld 1999), "Class switching" (Veränderung der Immunglobulinklasse) der Plasmazellen sowie Stimulation der T-Lymphozyten in Bezug auf Wachstum und Lebenszeit. Es wird ferner für die Proliferation von Mastzellen verantwortlich gemacht. IL-5 bewirkt bei Plasmazellen Mutation und Class switching zu IgA, außerdem stimuliert es Wachstum und Differenzierung der eosinophilen Granulozyten (Druihle und Pretolani 1998). IL-6 wird die Stimulation von

Wachstum und Reifung der B-Zelllinie zugeschrieben (Yamamoto *et al.* 1996). IL-10 bewirkt MHC II Expression in den B-Lymphozyten, supremiert Cytokinausschüttung und Proliferation von T_H1 Zellen (de Waal *et al.* 1991, Buelens *et al.* 1995). Aufgrund dieser Wirkungen wird den T_H2-Lymphozyten die Koordination der humoralen Immunantwort zugeschrieben. (Fiorentio *et al.* 1989, Vieira *et al.* 1991, Constant *et al.* 1997)

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Plasmazellen und B-Lymphozyten der arthrotisch veränderten Synovialmembran somatisch hochmutierte IgVH Gene aufweisen. Diese Veränderungen wurden dahingehend interpretiert, dass es sich um durch Antigenkontakt gereifte Zellen handelt (Krenn *et al.* 1999b).

Aus diesen Daten ergeben sich nun zwei Möglichkeiten bezüglich des Antigenkontaktes und der dadurch ausgelösten Reifung zu Gedächtniszellen, respektive Plasmazellen:

Entweder es erfolgt vor Ort in der Synovialmembran eine Maturation unter Ausbildung der dazu benötigten Keimzentren in den lymphozytären Gruppierungen oder bereits ausgereifte B-Zellen wandern in die Synovialmembran ein, dies bedeutet aber zugleich, dass die Aktivierung andernorts erfolgt sein muss.

In dieser Arbeit soll mittels immunhistochemische Analyse geklärt werden, welcher der beiden Mechanismen tatsächlich vorliegt.

1. Analyse der Verteilung der Isotypen in der Plasmazell-Population, um so zu zeigen, ob eine Dominanz von IgG⁺ oder IgA⁺ Plasmazellen vorliegt oder ob noch nicht Antigen aktivierten IgM⁺ Plasmazellen vorherrschen. Um das Proliferationsmuster des entzündlichen Infiltrates zu analysieren, erfolgte immunhistochemisch die Darstellung des proliferationsassoziierten Antigens Ki-67, das jede sich teilende Zelle expremiert (Gerdes *et al.* 1983).
2. Durch die Anwendung des immunhistochemischen Markers Ki-M4 und CD 23 wurde die Synovialmembran auf das Vorliegen follikulär-dentritischer

Zellen (FDC) analysiert, welchen eine Schlüsselrolle in der B-Zell Maturation zugeschrieben wird. (Johnson *et al.* 1986, Petrasch *et al.* 1990) In diesem Zusammenhang wurden die B-Lymphozyten auch auf die Expression von CD 40 analysiert, dass für die B-Zell Maturation ebenfalls von Bedeutung ist (Berek *et al.* 1997, Camacho *et al.* 1998).

3. Das Interleukin Expressionsprofil sollte in Hinblick auf das Vorliegen einer T_H1- oder T_H2-Antwort charakterisiert werden. Hierfür wurden Interleukin 2 und Interleukin 10 gewählt.

Interleukin 2 ist ein Cytokin der T_H1-Antwort. Es wirkt stimulierend auf das Wachstum der T-Zellen, in Maßen auch eine Proliferation von B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK) bewirkt. Interleukin 10 ist ein Cytokin, das der T_H2-Antwort zugeschrieben wird. Es suppremiert die T_H1 Zellen und fördert die Expression von MHC II.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Gewebe

Die Untersuchung umfasst das Material von 20 Patienten. In allen Fällen handelt es sich um klinisch diagnostizierte Arthrosen (Sulzbacher 2000, Hoaglund & Steinbach 2001). Von 19 der 20 Patienten lag das Material als kryopräserviertes Gewebe vor, bei einem Patienten wurde in Paraffin eingebettetes Material verwendet. Das Gewebe stammte in 18 Fällen aus dem Knie, in weiteren 2 Fällen handelte es sich um Synovialgewebe aus der Hüfte. (Tabelle 2.1)

2.2 Aufarbeitung des Gewebes

2.2.1 Aufarbeitung des Gewebes für Kryostatschnitte (Immunhistochemie)

Das Gewebe wurde sofort nach der Entnahme in 1x1x2,5cm große Kunststoffgefäßen mit Tissue Tek^R (Miles, Eckhart, USA) bedeckt und in flüssigem Stickstoff bei -180°C schockgefroren. Für immunhistochemische Färbungen wurden von den schockgefrorenen Gewebstückchen 7 µm dicke Seriengefrierschnitte an dem Kryostaten 2800 Frigocut N (Reichert-Jung, Nussloch) angefertigt, auf mit Silan beschichteten Objektträgern aufgebracht und zwölf Stunden lang luftgetrocknet. Diese wurden anschließend bei -70°C aufbewahrt.

2.2.2 Aufarbeitung des Gewebes für Paraffinschnitte (Immunhistochemie)

Die unmittelbar nach Gewebsentnahme in 4%igem, gepuffertem Formalin fixierten Gewebsblöcke (etwa 1x1x2cm) wurden in Paraffin eingebettet und mittels eines Mikrotoms 4 µm dicke Schnitte angefertigt, analog den Kryostatschnitten auf mit Silan beschichtete Objektträger verbracht und bei 37°C für 2 Stunden getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte entweder bei Raumtemperatur aufbewahrt oder es erfolgte die Entparaffinisierung in der absteigenden Alkoholreihe. Nach der Entparaffinisierung wurden die Schnitte für 15 Minuten in 30%iger Zitronensäure gekocht. Nach einem dreifachen Waschgang mit PBS waren die Paraffinschnitte für die anschließende Färbung vorbereitet.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Indirekte Immunperoxidase Technik (iIP)

Die indirekte Immunperoxidase Technik (iIP) wurde zum Nachweis der Plasmazell Antigene IgG, IgA, IgM, Kappa und Lambda, der B-Zell Antigene CD 20, CD 27 und CD 40, der T-Zell Antigene CD3, CD 4, CD 8, sowie den FDC-Antigenen Ki-M4 und CD 23, CD 68 (KiM6 = Makrophagenantigen) und Ki-67 (Proliferationsantigen) an Kryostatschnitten angewendet.

IgG, IgA, IgM, Kappa und Lambda sowie CD 20 und CD 23 wurden zusätzlich nochmals an Paraffinschnitten untersucht.

Der primäre Antikörper wurden 1:20 bis zu 1: 800 verdünnt (siehe Tabelle 2.2). Der sekundäre, peroxidase-konjugierte Kaninchen anti-Maus-Antikörper (DAKO Diagnostica, Hamburg) sowie der tertiäre, ebenfalls peroxidase-konjugierte Ziege anti-Kaninchen-Antikörper (Medac, Hamburg) wurde im Verhältnis 1:50 mit einem Gemisch aus 70% PBS-Puffer (pH 7,4) und 30% AB Rh-positivem Humanserum verdünnt. Für die Farbreaktion wurde hier 3,3 Diaminobenzidin (Sigma Chemie, Deisenhofen) in 10 ml PBS-Puffer (pH 7,4) gelöst; unmittelbar vor Auftragen auf die Schnitte wurde 5 µl 30%iges H₂O₂ (Merck, Darmstadt) zugesetzt, um die endogene Peroxidase-Aktivität zu unterdrücken.

Die indirekte Immunperoxidasetechnik umfaßt folgende Schritte: Nach einer 15-minütigen Acetonfixierung mit anschließender dreifacher PBS- Spülung wurden die Gefrierschnitte mit dem primären, sekundären und tertiären Antikörper je 30 min lang in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend in Tris-NaCl-Puffer (pH 7,4) gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Zur Entwicklung wurden die Schnitte 10 min mit dem DAB-Substratkomplex inkubiert und im Anschluß an die Substratentwicklung mit Tris-NaCl-Puffer (pH 7,4) gewaschen, um nicht verbrauchtes Diaminobenzidin zu entfernen. Die Schnitte wurden mit Hämalun-Lösung 5 min gegengefärbt und nach einer 10 minütigen Spülung unter laufendem Wasser, wurden die Präparate mit Kaisers® Glyceringelantine eingedeckt. Die nachzuweisenden Antigene stellten sich auf diese Weise als braune Präzipitate dar.

Um unspezifische Reaktionen sowohl des sekundären als auch des tertiären Antikörpers an den Schnittpräparaten beurteilen zu können, wurde als Kontrolle in allen Fällen der primäre monoklonale Antikörper durch AB Rh-positives Humanserum ersetzt. Durch diese Kontrolle konnte auch gleichzeitig eine mögliche, trotz der H₂O₂-Behandlung vorhandene, endogene Peroxidasereaktion beurteilt werden.

2.3.2 Indirekte Immunperoxidase Technik zum Cytokin Nachweis

Im Unterschied zum Nachweis zytomembranöser Antigene wie z. B. CD 20 wurden die Schnitte, die für den Cytokinnachweis bestimmt waren, im Anschluss an die Fixierung mit Aceton für weitere dreißig Minuten Sapronin-PBS inkubiert, um eine Permeabilität der Zellstrukturen für den Antikörper zu gewährleisten. Die Inkubationszeit mit dem primären Antikörper wurde auf eine Stunde verlängert. Im weiteren entsprach die Behandlung dem in 2.3.1. beschriebenen Procedere.

2.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz (iIFL)

Mithilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurden die Plasmazell-Antigene IgG, IgA und IgM, sowie die leichten Ketten Kappa und Lambda in Paraffinschnitten nachgewiesen. Nach einstündiger Inkubation mit den Primärantikörpern folgte dreimaliges Waschen der Schnittpräparate mit PBS sowie eine 60 minütige Inkubation mit dem, für den primären Antikörper jeweils spezifischen sekundären, Fluoreszein gekoppelten Antikörper FITC-konjugierter Rabbit-anti-Mouse für CD 20, FITC-konjugierter Goat-anti-Rabbit für IgG, IgA und IgM sowie Kappa und Lambda. Die im Anschluß einmal mit PBS gespülten Schnitte wurden erneut mit PBS zweimal gespült und dann mit der Einbettlösung für Immunfluoreszenz eingebettet. Die Auswertung erfolgte unmittelbar danach am Fluoreszenzmikroskop (Firma Leitz) bei einer Wellenlänge von 490 nm.

Um unspezifische Reaktionen sowohl des sekundären als auch des tertiären Antikörpers an den Schnittpräparaten beurteilen zu können, wurde als Kontrolle in allen Fällen der primäre monoklonale Antikörper durch AB Rh-positives Humanserum ersetzt. Durch diese Kontrolle konnte auch gleichzeitig eine Autofluoreszenz beurteilt werden.

2.4 Auswertung der Übersichtspräparate

Die mit Hämalaun gefärbten Präparate dienten zum einen als negative Kontrollen, zum anderen wurde an ihnen das Ausmaß des Entzündungsgrades festgehalten gemäß der Klassifikation nach Krenn 1999.

2.5 Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen

Die Intensität der zytoplasmatischen immunhistochemischen Reaktivität wurde semiquantitativ erfaßt und in einer Skala von -, o und + graduiert. (- = negative Reaktion, o= vereinzelte bis mäßige Reaktion, + = starke Reaktion), weiterhin wurde die Lokalisation der Zellen erfaßt und nach folgenden Regionen unterteilt: Lokalisation mit direkt räumlichem Bezug zur Deckzellschicht, perivaskuläre Lokalisation oder diffuse Lokalisation im Präparat.

In den immunhistochemisch auf IL-2 und IL-10 untersuchten Präparaten wurde noch eine zytomorphologische Differenzierung der Zellen in Rundzellen, Makrophagen oder Epithelzellen vorgenommen, um eine Aussage zu erhalten, ob die Zytokine von Lymphozyten, Makrophagen oder Epithelien produziert werden.

2.6 Statistische Analyse

Aufgrund der Datenlage (semiquantitative Beschreibung von räumlicher Verteilung und Ausprägungsgrad des entzündlichen Infiltrates) ist lediglich eine Beschreibung der Häufigkeitsverteilung möglich.

2.7 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation der immunhistochemischen Präparate erfolgte auf AGFA® RSX 50 für die iIP, auf Scotch®CHROME 640-T für die iIFL. Die Bilder wurden unter normierten Bedingungen mit einem Zeiss Axiophot erstellt.

2.8 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Anti Human CD Antikörper	PharMingen, Heidelberg
Peroxidase- konjugierte Kaninchen anti- Maus- Antikörper	DAKO, Dänemark
Peroxidase- konjugierte Ziege anti- Kaninchen- Antikörper	Medac, Hamburg
Kaisers® Glyceringelantine	Sigma Chemie, Deisenhofen
3,3 Diaminobenzidin	Sigma Chemie, Deisenhofen

2.9 Apparate

Produkt	Hersteller
Inkubationskammer	
Zentrifuge Biofuge 15 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Kryostat 2800 Frigocut GNA 100	Pharmacia, Freiburg
Rotationsschüttler	Vortex-Genie 2, N. Y. USA
Fluoreszenzmikroskop	(Firma Leitz)

2.10 Tabellen

Tabelle 2.1 Patienten und Gewebe

Patient Nr.	Fall Nr.	IFS	Alter	Geschlecht	Lokalisation
1	174	1	65	W	Knie
2	182	2	71	M	Knie
3	183	1	61	M	Knie
4	184	1	69	W	Knie
5	186	1	79	W	Knie
6	188	1	75	W	Knie
7	190	1	70	M	Knie
8	191	1	80	W	Knie
9	202	1	58	M	Knie
10	207	2	77	W	Knie
11	208	1	76	W	Knie
12	209	1	72	W	Knie
13	233	1	76	M	Knie
14	234	1	71	W	Knie
15	237	1	77	W	Knie
16	238	1	61	W	Hüfte
17	242	1	57	M	Hüfte
18	243	1	58	W	Knie
19	20553	1	78	W	Knie
20	22830	2	75	W	Knie

IFS = inflammatory score (nach Krenn 1999a)

Tabelle 2.2 Liste der monoklonalen Antikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Quelle
IgG	Maus/ <i>Kaninchen</i>	1:8000	Dianova, Hamburg, D.
IgA	Maus/ <i>Kaninchen</i>	1:4000	Pharmingen, USA
IgM	Maus/ <i>Kaninchen</i>	1:2	Kreipe <i>et al.</i> Würzburg / Hannover
Kappa	Maus/ <i>Kaninchen</i>	1:200	Dianova, Hamburg, D.
Lambda	Maus / <i>Kaninchen</i>	1:400	Dianova, Hamburg, D.
CD 20	Maus	1:4000	DAKO, Dänemark
CD 23	Maus	1:20	AG Kiel
CD 40	Maus	1:20	DAKO, Dänemark
CD 27	Maus	1:500	DAKO, Dänemark
CD3	Maus	1:100	Immunotech, Frankreich
CD 4	Maus	1:100	Dianova, Hamburg, D.
CD 8	Maus	1:200	Dianova, Hamburg, D.
IL-2	Maus	1:5	R&D SYSTEMS, Wiesbaden
IL-10	Maus	1:50	R&D SYSTEMS, Wiesbaden
Ki-M4	Maus	1:4000	Dianova, Hamburg, D
CD 68	Maus	1:8000	DAKO, Dänemark
Ki-67	Maus	1:10	Dianova, Hamburg, D

Kursive Spezies steht für Antikörper der Paraffinschnitte

3. Ergebnisse

Zunächst wurde der Ausprägungsgrad der Arthrose assoziierten Synovialitis anhand der Hämalaun Eosin (HE) Färbungen gemäß des Synovialitis-Entzündungs Grades (inflammatory score, ifs nach Krenn *et al.* 1999a) vorgenommen. Dabei bestätigte sich der im Vergleich zur Arthrose schwache Ausprägungsgrad der Entzündung. In 17 von 20 Fällen bestand Synovialitis Entzündungsgrad 1, in 3 von 20 ein Grad 2. (Siehe auch Tabelle 2.1)

3.1 Expression des B-Zell assoziierten Antigens CD 20 (Kryomaterial)

In der iIP ließen sich in 17/20 Fällen Infiltrate mit CD 20 positiven Lymphozyten nachweisen. In 13/20 Fällen handelte es sich um Infiltrate mit hohem Anteil, in 4/20 Fällen war ein mäßiger Anteil an CD 20+ Lymphozyten mit perivaskulärer Lokalisation auszumachen. Im Bereich der Deckzellschicht waren in 2 Fällen starke und in zwei weiteren Fällen mittelstarke Infiltrate mit CD 20 positiven Zellen nachweisbar. (Siehe Tabelle 3.1 sowie Abbildung 7-5)

CD 40+ Lymphozyten wurden in 10 von 19 Fällen stark perivaskulär in weiteren 5 Fällen mäßig ausgeprägt perivaskulär detektiert. In 5 von 19 Fällen ließen sich mäßig ausgeprägte CD 40+ Infiltrate im Bereich der Deckzellschicht nachweisen. (Siehe Tabelle 3.1)

3.2 Bestimmung der IgG, IgA und IgM Isotypen der Plasmazellen (Paraffin- und Kryomaterial)

Bei der Beurteilung der Infiltration mit Plasmazellen wurde nicht die Einteilung nach Lokalisation vorgenommen, da sich in sämtlichen Fällen weder diffus im Gewebe noch innerhalb der Deckzellschicht Plasmazellen nachweisen ließen. Es wurde lediglich die Stärke der Infiltrationen beurteilt. Da in den Kryostatschnitten starke, unspezifische Farbreaktionen die Auswertung erschwerten, wurden die Ergebnisse mittels der indirekten Immunfluoreszenztechnik aus Paraffinmaterial verifiziert (Tabelle 3.2 und Abbildung 7-2)

Starke entzündliche Infiltrationen mit IgG+ Plasmazellen ließen sich in 5/20 Fällen nachweisen, in weiteren 3 Fällen waren mäßig starke Infiltrate nachweisbar.

IgA+ Plasmazellen waren in 10/20 Fällen nachweisbar, aber nur in 3 Fällen fanden sich stark ausgeprägte Infiltrationen, die anderen 7 Fälle zeigten lediglich vereinzelt IgA positive Plasmazellen. (Abbildung 7-4 und Tabelle 3.2)

IgM+ Plasmazellen ließen sich nur 3/20 Fällen als vereinzelte Infiltrationen nachweisen.

Die Leichtketten Kappa und Lambda waren aufgrund starker, unspezifischer Farbreaktionen nur in 6 Fällen in den Kryostatschnitten beurteilbar. Es ergab sich ein stark positiver Nachweis von Kappa in 2/3 Fällen in 1/3 Fällen gelang ein Nachweis vereinzelter Kappa positiver Plasmazellen. Der Nachweis von Lambda war in 2/6 Fällen stark positiv in weiteren 4 Fällen war Lambda mäßig positiv ausgeprägt. Das Verhältnis von Kappa und Lambda zeigt sich ausgeglichen, so wie bei entzündlichen Prozessen zu erwarten. (siehe Tabelle 3.2)

3.3 Expression von Makrophagenantigenen (Kryomaterial)

Perivaskulär werden in 12/19 Fällen CD 68 stark positiv in weiteren 4/19 Fällen mäßig positiv nachgewiesen. In 3/19 Fällen gelang kein perivaskulärer Nachweis von CD 68. Das FDC-typische Ki-M4 wurde lediglich in 1/19 Fällen perivaskulär nachgewiesen.

Im Bereich der Deckzellschicht wurde CD 68 in 14/19 Fällen stark positiv und in weiteren 3/19 Fällen mäßig positiv nachgewiesen. Ki-M4 lies sich in keinen der 19 Fälle nachweisen. (Siehe Tabelle 3.3, Abbildung 7-6 und Abbildung 7-7)

CD 23+ Zellen fanden sich nur in 2 von 20 Fällen und auch nur perivaskulär. (Siehe Tabelle 3.1)

3.4 Expression der T-Zell Antigenen CD 4 und CD 8 (Kryomaterial)

In der iIP zeigten sich in 11/19 Fällen stark CD 4+ perivaskuläre Infiltrate, in 7/19 nur mäßige CD 4+ perivaskuläre Infiltrate. In 12/19 waren perivaskulär kräftige CD 8+ Infiltrate nachweisbar, in weiteren 4/12 Fällen mäßige CD 8+ Ausprägung.

Im Bereich der Deckzellschicht gab es in 8/19 Fällen starke und in weiteren 8/19 Fällen mäßige CD 4+ Infiltrate. Die Deckzellschicht war lediglich 2/19 Fällen stark und in weiteren 7/19 Fällen mäßig starke mit CD 8+ Lymphozyten. infiltriert

Morphologisch finden sich vor allem fokale perivaskuläre Infiltrationen mit CD 4+ Zellen. (Siehe Tabelle 3.4 sowie Abbildung 7-9 und Abbildung 7-10)

3.5 Gegenüberstellung der Expression von CD 4 und IL-2 (Kryomaterial)

In 3/4 Fällen der perivaskulär lokalisierten Zellen fand sich eine mäßig ausgeprägte IL-2 positive Infiltration, in 1/4 Fällen war kein IL-2 nachweisbar. Im Bereich der Deckzellschicht zeigte sich in einem Fall eine stark IL-2 positive Infiltration sowie in einem weiteren Fall eine mäßig IL-2 positive Infiltration. 2/4 Fälle waren keine IL-2 positiven Infiltrate nachweisbar.

Morphologisch handelte es sich bei den IL-2 positiven Zellen in 2/4 Fällen handelte es sich um lymphozytäre Zellen, in 4/4 Fällen wurden zusätzlich IL-2 positive Makrophagen nachgewiesen.

Die perivaskuläre Lokalisation der IL-2 positiven Zellen zeigte im Vergleich mit den CD 4+ Zellen in 2/4 Fällen Übereinstimmung.

Morphologisch entsprechen die CD 4+ und IL-2+ Zellen im Bereich der perivaskulären Infiltrate Lymphozyten und Makrophagen, im Bereich der Deckzellschicht nur den Makrophagen. (Siehe Tabelle 3.5)

3.6 Gegenüberstellung der Expression von CD 4 und IL-10 (Kryomaterial)

Perivaskulär zeigten 11/19 Fällen eine starke CD 4+ Infiltration, 7/19 Fällen zeigten eine mäßig Infiltration mit CD 4+ Zellen. 1/19 war CD 4 negativ. Im Vergleich dazu zeigten sich in 2/19 Fällen starke IL-10 positive perivaskuläre Infiltrationen, in weiteren 9/19 Fällen konnten mäßige Infiltrate mit IL-10 positiven Zellen nachgewiesen werden. In 8/19 Fällen blieb der IL-10 Nachweis negativ.

8/19 Fällen zeigten eine starke, CD 4+ Infiltration der Deckzellschicht. Weitere 8/19 Fälle zeigten eine mäßige CD 4+ Infiltration und in 3/19 Fällen waren CD 4 nicht in der Deckzellschicht nachweisbar.

Stark IL-10 positive Infiltrate ließen sich im Bereich der Deckzellschicht in 3/19 Fällen nachweisen, in 5/19 Fällen zeigte sich eine mäßige IL-10 positive Infiltration. In 11/19 Fällen waren keine IL-10 positive Zellen in der Deckzellschicht nachweisbar.

Morphologisch handelte es sich in 1/19 Fällen um stark IL-10 positive Lymphozyten. In 5/19 Fällen reagierten zusätzlich Makrophagen stark IL-10 positiv. Ein mäßig starker IL-10 Nachweis gelang in 10/19 Fällen an Lymphozytären Zellen und in 8/19 Fällen an Makrophagen. (Siehe Tabelle 3.6)

3.7 Expression von Cytokinen (IL-2 und IL-10)

In der direkten Gegenüberstellung der IL-2 und IL-10 Expression fanden sich perivaskulär keine stark positiven Nachweise von IL-2 oder IL-10 in 4/4 Fällen. Dem perivaskulär mäßig positiven Nachweis von IL-2 in 3/4 Fällen steht eine mäßig positive Reaktion in 1/4 Fällen mit IL-10 entgegen. IL-2 lies sich in 1/4 Fällen mäßig positiv und in einem der Fälle stark positiv im Bereich der Deckzellschicht nachweisen. IL-10 dagegen war nur in 1/4 Fällen in der Deckzellschicht nachweisbar, in 3/4 Fällen war IL-10 nicht nachweisbar.

Morphologisch handelte es sich bei den IL-2 positiven Zellen in 2/4 Fällen um Lymphozytäre Zellen und in 4/4 Fälle um Makrophagen. IL-10 lies sich in 2/4 Fällen in lymphozytären Zellen und in Makrophagen nachweisen, in 2/4 Fällen war IL-10 keiner der Zelltypen nachweisbar. (Siehe Tabelle 3.7 sowie Abbildung 7-11 und Abbildung 7-12)

3.8 Expression von Ki-67 (Kryomaterial)

In den perivaskulär lokalisierten Zellansammlungen waren in 6/19 Fällen eine Ki-67 positive Zellen nachweisbar, des Weiteren ließ es sich in den Endothelzellen nachweisen. (siehe Tabelle 3.3 sowie Kapitel 6, Abbildung 7-8)

3.9 Tabellen

Tabelle 3.1 B-Zell Antigene

	CD 20			CD 23			CD 27			CD 40		
NR	P_Vask	Deckz	Diff	P_Vask	Deckz	Diff	P_Vask	Deckz	Diff	P_Vask	Deckz	Diff
174	+	-	-	-	-	-				+	-	-
182	o	-	-	-	-	-				o	-	-
183	o	-	o	-	-	-				o	-	-
184	o	-	-	-	-	-				o	-	-
186	+	-	-	-	-	-				n.b.	HG	HG
188	+	-	o	-	-	-				n.b.	HG	HG
190	-	-	-	-	-	-				o	-	-
191	+	+	o	-	-	-				+	-	-
202	+	-	o	-	-	-	+	o	-	+	o	-
207	+	o	-	+	-	-				+	o	-
208	o	-	-	-	-	-				n.b.	HG	HG
209	-	-	-	-	-	-				+	o	-
233	+	-	-	-	-	-	+	+	o	+	-	-
234	+	-	-	-	-	-	+	o	-	+	-	-
237	+	+	-	-	-	-				+	o	-
238	-	-	-	-	-	-	+	o	-	o	-	-
242	+	-	-	-	-	-				+	-	-
243	+	-	-	-	-	-				n.b.	HG	HG
20553	+	o	-	-	-	-				+	o	-
22830	+	-	-	o	-	-						
Anzahl +	13	2	0	1	0	0	4	1	0	10	0	0
Anzahl o	4	2	4	1	0	0	0	3	1	5	5	0
Anzahl -	3	16	16	18	20	20	0	0	3	0	10	15

n.b. = nicht beurteilbar; HG = Hintergrund, d. h. der Schnitt zeigte zuviel unspezifische Färbung.

Tabelle 3.2 Plasmazell Antigene

	IgG	IgA	IgM	Kappa	Lambda
NR					
174	n.b.	o	n.b.	n.b.	o
183	+	-	-	n.b.	n.b.
184	o	o	n.b.	n.b.	n.b.
186	n.b.	o	n.b.	n.b.	o
188	n.b.	o	-	n.b.	n.b.
191	o	-	o	n.b.	o
202	+	+	o	o	o
207	o	+	o	+	+
233	+	+	-	n.b.	n.b.
234	+	o	n.b.	n.b.	n.b.
237	-	o	n.b.	n.b.	n.b.
22830	+	o	-	+	+
Anzahl +	5	3	0	2	2
Anzahl o	3	7	3	1	4
Anzahl -	1	2	4	0	0

Immunglobulin Klassen: IgG, IgA, IgM und Leichtketten Antigene Lambda und Kappa

n.b. = nicht beurteilbar;

Tabelle 3.3 Antigene der antigenpräsentierenden Zellen

NR	Antigen präsentierende Zellen						Proliferations Antigen		
	Ki-M4			CD 68			Ki-67		
	P_Vask	Deckz	Diff	P_Vask	Deckz	Diff	P_Vask	Deckz	Diff
174	-	-	-	+	+	-	0	0	-
182	-	-	-	-	+	-	-	-	-
183	-	-	-	+	+	0	+	0	-
184	-	-	-	+	+	0	-	0	-
186	-	-	-	-	+	0	0	0	-
188	-	-	-	-	-	-	-	-	-
190	-	-	-	0	0	+	-	-	-
191	-	-	-	+	+	0	-	0	0
202	-	-	-	0	0	+	-	-	-
207	+	-	-	+	+	0	-	+	0
208	-	-	-	+	0	+	-	0	-
209	-	-	-	+	-	0	-	-	-
233	-	-	-	+	+	0	-	-	-
234	-	-	-	+	+	0	0	0	-
237	-	-	-	+	+	-	0	0	-
238	-	-	-	0	+	0	-	-	-
242	-	-	-	0	+	0	0	-	-
243	-	-	-	+	+	-	-	0	-
20553	-	-	-	+	+	-	-	0	-
22830									
Anzahl +	1	0	0	12	14	3	1	1	0
Anzahl 0	0	0	0	4	3	10	5	10	2
Anzahl -	18	19	19	3	2	6	13	8	17

(Ki-M4 für FDC, CD 68 für Makrophagen)

Tabelle 3.4 Verteilungsmuster T-Lymphozyten

NR	CD 3			CD 4			CD 8		
	P_Vask	Deckz	Diff	P_Vask	Deckz	Diff	P_Vask	Deckz	Diff
174	+	0	0	+	0	-	+	-	-
182	-	-	-	0	0	-	0	0	-
183	-	-	-	+	0	+	-	-	-
184	-	-	-	+	+	-	+	0	-
186	0	-	-	0	0	0	+	0	-
188	-	-	-	-	-	-	-	-	-
190	-	0	-	0	0	-	-	0	-
191	0	0	-	0	+	0	0	0	0
202	+	0	-	0	-	0	+	-	-
207	+	-	-	+	0	-	+	-	-
208	-	-	-	+	+	-	+	-	-
209	-	-	-	0	0	-	0	-	-
233	+	-	-	+	-	-	+	-	-
234	+	-	-	+	+	0	+	-	0
237	+	0	-	+	+	0	+	+	-
238	-	-	-	+	+	-	+	0	-
242	-	-	-	+	0	+	+	-	0
243	0	0	-	0	+	-	0	0	-
20553	+	+	-	+	+	-	+	+	-
22830	0	-	-	0	-	0	0	0	0
Anzahl +	7	1	0	11	8	2	12	2	0
Anzahl 0	4	6	1	8	8	6	5	8	4
Anzahl -	9	13	19	1	4	12	3	10	16

Tabelle 3.5 Gegenüberstellung der CD 4 / IL-2 Expression

NR	IFS	CD 4			IL-2					
		P_Vask	Deckz	Diff	P_Vask	Deckz	Diff	RZ	M0	Fib
186	1	o	o	o	-	o	-	-	o	-
202	1	o	-	o	o	-	-	+	+	-
209	1	o	o	-	o	-	-	-	o	-
237	1	+	+	o	o	+	-	o	+	-
242	1	+	o	+	o	-	-	+	o	-
243	1	o	+	-	-	-	-	-	-	-
20553	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Anzahl +		3	3	1	0	1	0	2	2	0
Anzahl o		4	3	3	4	1	0	1	3	0
Anzahl -		0	1	4	3	5	7	4	2	7

Tabelle 3.6 Gegenüberstellung der CD 4 / IL-10 Expression

NR	IFS	CD 4			IL-10					
		P_Vask	Deckz	Diff	P_Vask	Deckz	Diff	RZ	M0	Fib
174	1	+	o	-	o	+	-	o	+	-
182	2	o	o	-	o	-	-	o	o	-
183	1	+	o	+	-	-	-	-	-	-
184	1	+	+	-	-	o	-	o	o	-
186	1	o	o	o	-	o	-	o	o	-
188	1	-	-	-	o	o	-	o	+	-
190	1	o	o	-	o	+	-	-	+	-
191	1	o	+	o	o	o	o	o	o	-
202	1	o	-	o	o	-	-	o	o	-
207	2	+	o	-	+	-	-	o	+	-
208	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-
209	1	o	o	-	-	-	-	-	-	-
233	1	+	-	-	o	-	-	-	o	-
234	1	+	+	o	o	o	-	o	o	-
237	1	+	+	o	-	-	-	-	-	-
238	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-
242	1	+	o	+	-	-	o	-	o	-
243	1	o	+	-	o	-	-	o	-	o
20553	1	+	+	-	+	+	-	+	+	-
22830	2	o	-	o						
Anzahl +		11	8	2	2	3	0	1	5	0
Anzahl o		8	8	6	9	5	2	10	8	1
Anzahl -		1	4	12	8	11	17	8	6	18

Tabelle 3.7 Gegenüberstellung von IL-2 und IL-10

NR	IFS	IL-2						IL-10					
		P_Vask	Deckz	Diff	RZ	M0	Fib	P_Vask	Deckz	Diff	RZ	M0	Fib
182	2							0	-	-	0	0	-
184	1							-	0	-	0	0	-
186	1	-	0	-	-	0	-	-	0	-	0	0	-
188	1							0	0	-	0	+	-
191	1							0	0	0	0	0	-
202	1	0	-	-	+	+	-	0	-	-	0	0	-
207	2							+	-	-	0	+	-
209	1	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-
233	1							0	-	-	-	0	-
234	1							0	0	-	0	0	-
237	1	0	+	-	0	+	-	-	-	-	-	-	-
242	1	0	-	-	+	0	-	-	-	0	-	0	-
243	1	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	0
20553	1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
22830	2												
Anzahl +		0	1	0	2	2	0	2	3	0	1	5	0
Anzahl 0		4	1	0	1	3	0	9	5	2	10	8	1
Anzahl -		3	5	7	4	2	7	8	11	17	8	6	18

4. Diskussion

4.1 Pathogenese der Arthrose

Arthrose wird als Synonym für die Gelenkerkrankung mit Knorpelschädigung ohne assoziierte klinische oder laborchemisch diagnostizierbare Ursache verwendet. (Remmele 1997, Shaun *et al.* 2000).

Es gibt verschiedene Einteilungen der Arthrose, entweder nach Lokalisation (regional versus generalisiert) oder verantwortlicher Ursache (unbekannt = ideopathisch versus bekannt, z.B. durch Stoffwechseldefekte wie Hämoglobinopathien, Kristallarthropathien oder ischämisch bedingt. (Altman 1991)).

In den letzten Jahren wurden vielfältige Einflüsse auf die Entstehung und den Verlauf der Arthrose zusammengetragen, die ihren Schwerpunkt auf biomechanische, biochemische, genetische und entzündliche Prozesse legen (Holderbaum *et al.* 1999).

Als Beispiel für die biomechanischen Ursachen wurden die Störungen der Gelenkkongruenz infolge von Gelenkabnormitäten (Wedge *et al.* 1991), mechanische Überbelastungen (Felsen *et al.* 1994, Vingård *et al.* 1991) und Übergewicht (Blanco *et al.* 1996) beschrieben. Es wird angenommen, dass ein Mißverhältnis aus Gelenkbelastung und Belastbarkeit am Anfang der Erkrankung steht.

Weiter wird postuliert, dass die biomechanische Komponente durch ihr Mißverhältnis von Belastung und Belastbarkeit verantwortlich ist für die biochemische Komponente. Als biochemische Ursachen kann man die Proteasenfreisetzung ansehen. Es kommt zur Freisetzung proteolytischer Enzyme, z.B. Matrix-Metalloproteinase-13, deren Bedeutung, im "transgenen murine" Osteoarthrose Modell belegt werden konnte. (van den Berg 2001). Diese können zu einer Reduktion der Proteoglykane führen und so eine reduzierte Knorpel elastizität verursachen. Aigner konnte nachweisen, dass zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Metallproteasen freigesetzt werden (Aigner *et al.* 2001).

Die entzündliche Komponente findet sich der Synovialitis wieder, in deren Rahmen es z.B. zur Ausschüttung inflammatorischer Cytokine (z.B. Interleukin 1) kommt. Darauf wird im weiteren Verlauf noch ausführlicher eingegangen.

Im Verlauf der Erkrankung kommt es zunächst zu Reparaturversuchen, in deren Rahmen es zu verschiedenen Prozessen kommt. Die Reparaturversuche bestehen in einer vermehrten Produktion von Proteoglykanen und Kollagenen sowie in der Zunahme der Chondrozyten via Zellteilung (Fassbender 1987). Die Versuche der Kompensation führen schließlich zu einem Missverhältnis der vertretenen Kollagentypen (Aigner *et al.* 1995), sowie aufgrund biochemischer, inflammatorischer und ernährungstechnischer Faktoren zum Zelltod der Chondrozyten. Anhand der Tiermodelle konnte z.B. nachgewiesen werden, das Stickstoffmonoxid (NO) die Apoptose der Chondrozyten vermitteln kann. (van den Berg 2001).

Daraus resultiert schließlich die schon lang bekannte Erosion des Knorpels. Dabei sind die Defekte nicht nur auf die kongruierenden Gelenkflächen beschränkt, es kann auch zu Kontinuitätsdefekten im verkalkten Knorpel kommen (Radin *et al.* 1991) und es kann reaktiv auf den Knorpelverlust zu ischämischen Knochennekrosen kommen, die Mohr bereits 1993 beschrieb. Eine weitere Folge des Knorpelverlustes sind Pseudozysten, die sich nach Eindringen von Synovialflüssigkeit in die Knochendefekte ausbilden (Rhaney & Lamb 1955). Die im Rahmen der Arthrose auftretende Synovialitis wird für die Entwicklung von Randexostosen verantwortlich gemacht (Mohr *et al.* 1986)

4.2 Die Synovialitis der Arthrose

Die Problematik der Arthrose wird zum einen durch den Knorpelabbau bestimmt, zum anderen kommt es auch zu Veränderungen der Synovialmembran in Form einer entzündlichen Reaktion. Diese Entzündungsreaktion ist eine Reaktion auf die degenerativen Prozesse im Knorpel und deshalb eine sekundäre Entzündung. Sie ist oft die erste klinische Manifestation der Arthrose (Fassbender *et al.* 1987), bestimmt aber durch ihren Ausprägungsgrad und eigene Prozesse den Verlauf der Arthrose im wesentlichen mit.

Makroskopisch imponiert dabei eine feingranuläre oder feinvillöse bis zu einer stärker zottigen villösen Hyperplasie (Remmele *et al.* 1997). Histologisch werden zwei Formen der Entzündungen beschrieben. Je nach vorherrschender Komponente spricht man von

lymphoplasmazellulärer Synovialitis oder Detritussynovialitis (Mohr 2000a). Beide können aber gemeinsam in einem Präparat vorkommen.

4.2.1 Detritussynovialitis

Bei der Detritussynovialitis befinden sich bereits kleinste Knorpel- oder sogar schon Knochenfragmente im synovialen Gewebe. In diesen Geweben findet sich im Bereich der Knorpel oder Knochenfragmente eine verstärkte Fibrosierung, ödematöse Schwellung und wie bei der lymphoplasmazellulären Synovialitis ein leichtes lymphozytäres und plasmazellreiches Infiltrat.

4.2.2 Lymphoplasmazellulärer Synovialitis (LPS)

Das Gewebe zeichnet sich durch eine nur geringgradig verbreiterte Deckzellschicht aus, das Stroma ist locker strukturiert und zellarm. Es finden sich in allen Bereichen in unterschiedlich starker Ausprägung Lymphozyten, jedoch fällt auf, dass vor allem perivaskulär starke lymphozytäre Infiltrate imponieren, in deren weiterer Peripherie sich Plasmazellen aufhalten. Lymphatische Follikel oder vergleichbare lymphozytäre Aggregate, bestehend aus B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und FDC Netzwerken finden sich nur sehr selten (Ristow *et al.* 1999). Dies steht im Gegensatz zu den im entzündlichen Infiltrat der rheumatoiden Arthritis (RA) beschriebenen Zuständen. Dort wurden dem Keimzentrum entsprechend oder vergleichbar aufgebaute Strukturen mittels Ki-M4 nachgewiesen (Krenn *et al.* 1996).

Insgesamt ist das entzündliche Infiltrat der LPS wesentlich geringer ausgeprägt als in der RA, was sich auch im Entzündungsgrad (IFS) nach Krenn *et al.* 1999a zum Ausdruck bringt, denn in 17 von 20 Fällen bestand ein IFS von 1, drei weitere zeigten einen IFS von maximal 2. Hier decken sich also die Daten dieser Arbeit mit der bisherigen Literatur.

4.3 Immunologische Charakterisierung des entzündlichen Infiltrates der Arthrose

Es gibt bereits einige Arbeiten zu diesem Thema, die versucht haben das entzündliche Infiltrat der Arthrose zu charakterisieren. Folgende Zellpopulationen wurden gefunden:

Revell beschrieb in seiner Arbeit B-Lymphozyten, Makrophagen sowie T-Helfer und Suppressor Zellen. (Revell *et al.* 1988). Dabei zeigte sich, dass in der Hälfte der untersuchten Fälle eine diffuse Zellverteilung vorherrschte und nur wenige lymphozytäre Aggregate im Sinne eines Lymphfollikels. Kennedy beschrieb, dass das Verhältnis der CD 4+ zu CD 8+ T-Lymphozyten ausgewogen sei und das bei den Plasmazellen der Isotyp IgG prädominant ausgeprägt war (Kennedy *et al.* 1988). In meiner Arbeit sollte die Zellverteilung nochmals überprüft werden, um den Datenbestand abzurunden und Rückschlüsse über den Zustand von Plasmazellen und Lymphozyten zu erhalten, die eine Aussage möglich machen sollen, ob bereits aktivierte Zellen einwandern oder eine Aktivierung vor Ort stattfindet.

4.3.1 Lymphozyten der lymphoplasmazellulären Synovitis

In den bisherigen Arbeiten wurden bereits B-Lymphozyten sowie C4+ und CD 8+ T-Lymphozyten identifiziert (Fritz *et al.* 1981, Kennedy *et al.* 1988). In dieser Arbeit wurde neben der Identität der Zelltypen auch ihre Lokalisation berücksichtigt, um Rückschlüsse über die Interaktion zu erlangen. Die CD 20+ B-Lymphozyten fanden sich in 17 der 20 Fälle vor allem perivaskulär angeordnet, nur vereinzelt im Bereich der Deckzellschicht oder im Stroma verteilt. Sowohl CD 4+ Lymphozyten als auch CD 8+ Lymphozyten fanden sich ebenfalls mit Schwerpunkt im perivaskulären Bereich. Dies suggeriert zwei Dinge: Zum einen scheinen die B-Lymphozyten perivaskulär gerade eingewandert zu sein, zum anderen scheinen sich die meisten immunmodulatorischen Prozesse ebenfalls im perivaskulären Raum abzuspielen. Um weitere Daten hinzuzuziehen, wurde das plasmazelluläre Infiltrat näher auf seine Dignität untersucht.

4.3.2 Isotypen der Plasmazellen

Die Plasmazellen fanden sich von der Lokalisation strikt perivaskulär angeordnet und zwar entweder in unmittelbarer Nachbarschaft zu den CD 20+ Lymphozyten oder alleinstehend unmittelbar an Kapillaren oder Gefäßwänden angelagert. Es dominieren unter den Plasmazellen vor allem die Isotypen IgA und IgG in der Nachbarschaft der CD 20+ Lymphozyten. Die rein an der Gefäßwand assoziierten Plasmazellen gehörten dem Isotyp IgG an. IgM+ Plasmazellen fehlen dagegen fast vollständig. Dieser Befund

ist gleichbedeutend damit, dass bereits ein Wechsel des Immunglobulinisotypes von IgM (oder IgD) stattgefunden hat. Dieser Klassenwechsel von IgM zu IgG erfolgt unter physiologischen Bedingungen ausschließlich in Keimzentren (MacLennan 1994, Camacho *et al.* 1998), da dazu im Verlauf des Reifungsprozesses FDCs benötigt werden.

Führt man sich nun die strukturelle Anordnung von B-Lymphozyten und Plasmazellen sowie den vorherrschenden Isotyp IgG der Plasmazellen vor Augen, hat es den Anschein, dass bereits gereifte B-Lymphozyten, also Gedächtniszellen in das Gewebe einwandern und unter Einfluß der CD 4+ T-Lymphozyten eine Metamorphose zur Plasmazelle vollziehen.

Um diese Schlussfolgerung weiter zu überprüfen, muss zum einen kontrolliert werden, inwieweit eine Keimzentrumsreaktion in der Synovialitis von OA vorhanden ist und welchen Einfluss die CD 4+ T-Lymphozyten auf das Geschehen haben.

4.3.3 Synoviale oder extrasynoviale Maturation ?

Um aus einem unreifen B-Lymphozyten eine Plasmazelle oder einen B-Gedächtnislymphozyten entstehen zu lassen, ist ein Keimzentrum („germinal centre“, gc) erforderlich (Berek 1992). Zunächst wird der erste Antigenkontakt zwischen unreifen B-Lymphozyten und antigenpräsentierender Zelle hergestellt. Letztere kann ein Makrophage, eine follikulär-dentrische Zelle oder ein anderer B-Lymphozyt sein (Birk *et al.* 2001).

Dabei überprüft der unreife Lymphozyt, ob er über den passenden Bindungsmechanismus für das Antigen verfügt. Ist das der Fall, erfolgt eine Aktivierung der unreifen B-Zelle, die den Reifungsprozess (in Form von IgV_H Punktmutation) anstößt (Berek *et al.* 1985). In einem weiteren Schritt benötigt die reifende Zelle wiederum Kontakt zu FDCs um die Spezifität ihres Antikörpers zu überprüfen und gegebenenfalls die Maturation fortzusetzen. Im abschließenden Schritt erfolgt nochmals eine Kontrolle durch T-Lymphozyten, ohne den die reife B-Zelle / Plasmazelle nicht überleben kann. Dieser Reifungsprozess erfolgt im Keimzentrum (Camacho *et al.* 1998, Mellman *et al.* 2001).

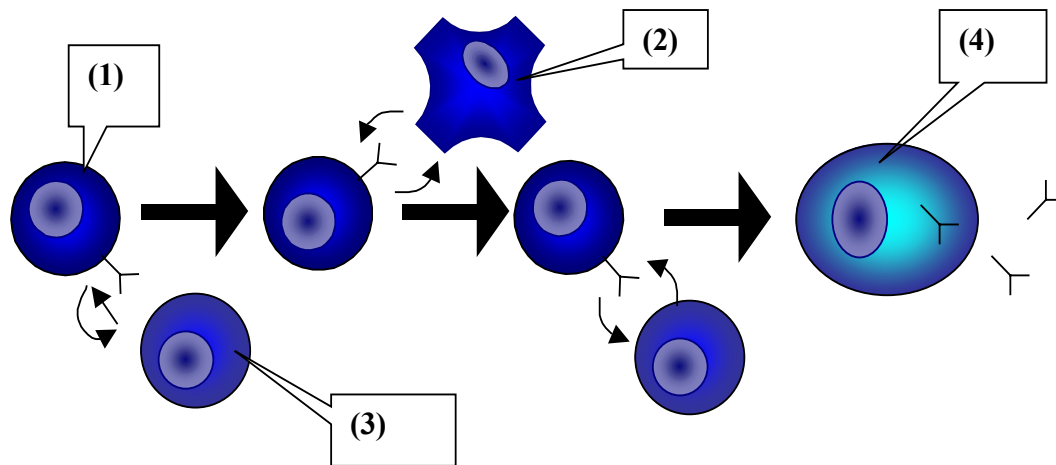


Abbildung 4-1:

Schematische Übersicht über die Keimzentrumsreaktion

(1)= B-Zelle, **(2)** = FDC, **(3)**= T-Lymphozyten, **(4)** = Plasmazelle

Folglich besteht ein Keimzentrum aus folgenden Komponenten: B-Lymphozyten, FDCs, CD 4+ T-Lymphozyten, sowie verschiedene Stadien vom Immunoblasten zur Plasmazelle und B-Gedächtniszelle. In der HE-Färbung lässt sich anhand des klassischen Lymphfollikels bereits eine histologische Gliederung erkennen. Der sogenannte Sekundärfollikel besteht aus einem basophilen Randsaum und einem ebenfalls basophilen, aber aufgehellten Zentrum. CD 4+ T-Lymphozyten, unreife B-Lymphozyten wie auch B-Gedächtniszellen befinden sich im Randsaum des Follikels, FDCs, CD 4+ T-Lymphozyten und die Immunoblasten im Keimzentrum.

In neueren Arbeiten wird das Keimzentrum immunologisch anhand von Ki-M4, dem FDC Oberflächenantigen und Ki-67, einem karyoplasmatischen Antigen, dass von proliferativ aktiven Zellen expremiert wird charakterisiert (Gerdes *et al.* 1983). Dabei zeigt sich eine Gliederung in eine FDC-arme (Ki-M4-), proliferationsaktive (Ki-67+) Zone und eine FDC-reiche (Ki-M4+), proliferationsarme (Ki-67-) Zone (Camacho *et al.* 1998).

Um ein Keimzentrum immunhistochemisch nachzuweisen, benötigt man also monoklonale Antikörper gegen Ki-M4, CD 23, Ki-67 sowie für die Lymphozyten CD 20, CD 4.

In 19 der 20 untersuchten Präparate waren keine FDCs nachweisbar. Nur in 1 von 20 Fällen war ein sogenanntes keimzentrumsähnliches Infiltrat nachweisbar, also muss davon ausgegangen werden, dass der überwiegende Anteil der vorgefunden B-Lymphozyten entweder keine FDC vermittelte Reifung benötigt oder, was wesentlich wahrscheinlicher ist, bereits den Reifungsprozess an anderer Stelle zu einer anderen Zeit durchlaufen hat und nun ein Gedächtnis B-Lymphozyt ist.

Das entzündliche Infiltrat der Arthrose assoziierten Synovialitis zeigt einen hohen Makrophagenanteil. Diese wurden mittels mAk gegen CD 68 nachgewiesen. Sie sind in der Lokalisation etwa gleich stark im perivaskulären Bereich als auch in der Deckzellschicht vertreten.

Ortsständige Fibroblasten sind bei der rheumatoiden Arthritis in der Lage reife B-Lymphozyten, also Gedächtniszellen, bei der Differenzierung zu Plasmazellen zu unterstützen. (Reparon-Schuijt *et al.* 2001) Es gibt keine Hinweise, dass diese Funktion von anderen Zellen außerhalb des Keimzentrums übernommen werden kann. Die Prädominanz von IgG+ Plasmazellen mit somatisch mutierten IgV_H-Genen in Abwesenheit von Keimzentren spricht für die Einwanderung von bereits Antigen aktivierten B-Lymphozyten in die Synovialmembran der Osteoarthritis (Krenn 1999b, Souto-Carneiro *et al.* 1999, Ristow *et al.* 1999).

4.4 Die Rolle von Zytokinen in der OA

Welche Rolle spielen nun die Zytokine in der Entzündungsreaktion bei Arthrose? Van den Berg beschreibt im Falle der Arthrose drei Arten von Zytokinen: Aufbauende, regulierende und zerstörende Zytokine. Als Beispiel für die destruktiven Zytokine führt er IL-1 und TNF an. IL-4, IL-10, IL-6 und IL-13 stehen für regulatorische Zytokine, insulin-like growth factor (IGF), Transforming growth factor β (TGF β) und andere stehen für die anabolen Zytokine (van den Berg 1999).

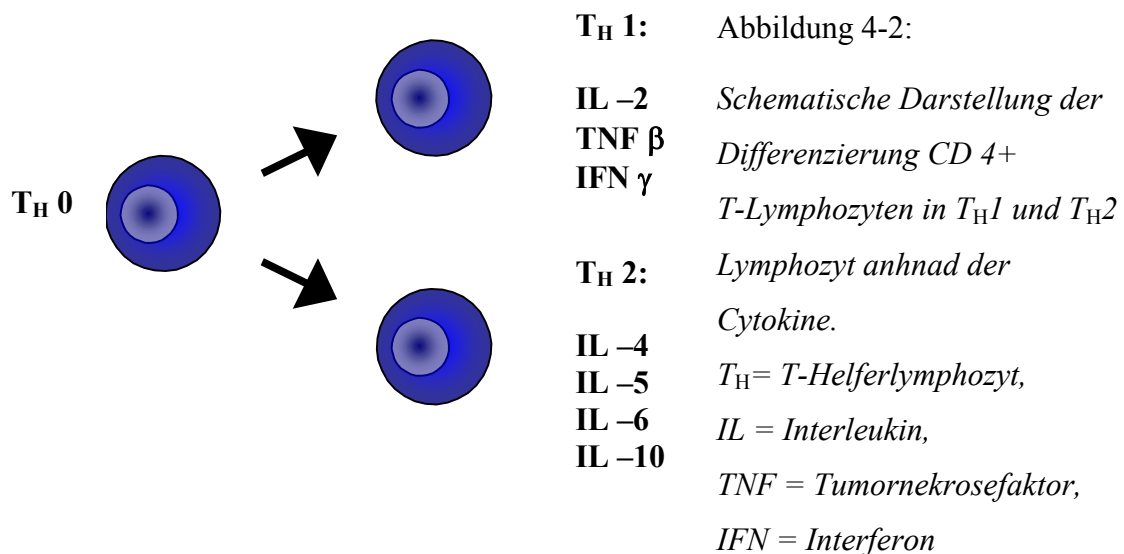
Die destruktive Wirkung von IL-1 β und TNF wird eindrücklich in der Arbeit von Moos *et al.* 2001 beschrieben. Unter Einfluss dieser Zytokine kommt es bei den Chondrozyten zu einer verminderten Proteoglykansynthese, wodurch die Elastizität und Belastbarkeit

des hyalinen Gelenkknorpels abnimmt. IL-1 β wird dabei als 100 mal potenter als TNF eingestuft. Reaktiv auf diese Zytokine kommt es zu einer verstärkten Expression der Zytokine IL-4, IL-10 und TGF β . Ob diese Expression durch IL-1 β initiiert ist oder als Kontraregulation zu betrachten ist, kann noch nicht beantwortet werden. IL-10 wird in anderen Arbeiten die Rolle eines antiinflammatorischen Zytokins zugeschrieben (Martel-Pelletier 1999), so dass es durchaus denkbar ist, dass IL-10 reaktiv zum Schutz der Chondrozyten sezerniert wird.

4.5 Subtypen der T-Helferzellen und ihre Bedeutung für das entzündliche Infiltrat bei Arthrose

Die gängige Einteilung der CD 4+ T-Lymphozyten wurde 1986 von Mosmann *et al.* anhand von Lymphokin- und Proteinmuster vorgenommen. Anhand dieser Sekretionsmuster hatte er eine Einteilung der CD 4+ T-Lymphozyten in T-Helferzellen Typ 1 (T_H1) und T-Helferzellen Typ 2 (T_H2) vorgenommen und publiziert. T-Helferzelle Typ 1 produzierte Interleukin 2 (IL-2), GM-CSF und Interleukin 3 Typ 2 zeichneten sich durch eine Produktion von IL3, BSF1 und einem Mastzellen Wachstumsfaktor. Dieses Modell wurde an Leishmanien infizierten Mäusen etabliert und in anderen Bereichen der Immunologie (z.B. Autoimmunerkrankungen, Transplantationsmedizin etc.) bestätigt.

Zu Anfang der Immunantwort auf ein Antigen steht die noch undifferenzierte CD 4+ T-Helferzelle. Diese auch als T_H0 bezeichnete Zellen, sind dabei durch die Produktion von Zytokinen beider Subtypen identifizierbar. In Abhängigkeit von verschiedenen Einflüssen, nämlich der Natur des Antigens, seiner Konzentration, der Lokalisation des Erstkontaktes und damit der Art der antigenpräsentierenden Zelle sowie das vorherrschende Zytokinmilieu bewirken die Differenzierung zu den jeweiligen Subtypen T_H1 oder T_H2. (Mueller *et al.* 1989, Seder *et al.* 1994, Altman *et al.* 1990, van Seventer *et al.* 1991, Springer 1990)



4.5.1 Differenzierung der T-Helferzellen anhand der Zytokinmuster

Das vereinfachte Modell der Subtypenzuordnung lautet, dass die T_H1 Zellen für die zellvermittelte Immunantwort zuständig sind, während die T_H2 Zellen für die humorale und die IgE vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion verantwortlich sind. (Wong *et al.* 2001)

Die Zytokine Interferon γ, Interleukin 2 (IL-2), und Tumornekrosefaktor (TNF) werden in den CD 4+ T-Lymphozyten des Typ 1 zugeordnet.

Interferon γ (IFN-γ) bewirkt eine zelluläre Resistenz gegenüber Viren. Es wirkt auf Makrophagen stimulierend bezüglich ihrer Proliferations- und Phagozytoseaktivität. Dabei kommt es zu einer verstärkten Expression von MHC I und MHC II. Bei bestimmten Erregern (Tbc, Listerien) ist diese Aktivierung der Makrophagen besonders wichtig, damit sie die Erreger abbauen können. Bei der B-Zell Population bewirkt IFN den Klassenwechsel zu IgG2. Ferner bewirkt es die verstärkte Sekretion anderer Zytokine, z.B. IL-12 (Trinchieri *et al.* 1996). Auf T_H2- Lymphozyten wirkt IFN-γ hemmend bezüglich Differenzierung und Funktion.

Interleukin 2 (IL-2) bewirkt eine Zunahme von antigenstimulierten T-Lymphozyten, induziert Lymphokin aktivierte Killerzellen, moduliert die HLA Expression und induziert die Sekretion anderer Lymphokine, z.B. IFN-γ.

Tumornekrosefaktor β (TNF- β) ist auch als Lymphotoxin bekannt. Der TNF ist ein Produkt antigenaktivierter Lymphozyten und bewirkt die charakteristischen Zeichen einer bakteriellen Sepsis. Für TNF- α wird auch der Begriff Kachektin verwendet, da es die katabole Komponente des Faktors beschreibt, die im klinischen Kontext neben Fieber zu Gewichtsverlust und Nachtschweiss führt.

Für den Typ 2 stehen die Cytokine Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 5 (IL-5), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 10 (IL-10) und Interleukin 13 (IL-13). Den jeweiligen Zytokinen werden dabei eine oder mehrere Funktionen zugeordnet.

IL-4 fördert die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen. Bei Plasmazellen kommt es zum Klassenwechsel der Isotypen zu IgG4 und IgE. Daneben Stimulation zur Expression von MHC II auf B-Lymphozyten. Eine weitere Wirkung ist die Inhibition von Lymphokin aktivierten Killerzellen sowie Inhibition von IL-2 vermittelter B-Lymphozyten Proliferation. IL-4 bewirkt die Verstärkung der proliferativen Wirkung von G-CSF (granulocyte-cell-stimulating factor) auf das phagozytierende System (Breedveld 1999).

IL-5 bewirkt IgM Sekretion, haptenvermittelte IgG Produktion sowie Proliferation und Ausreifung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen mit Mutationen der IgVH-Gene sowie den Klassenwechsel der Isotypen. Des Weiteren stimuliert IL-5 Wachstum und Differenzierung der eosinophilen Granulozyten. (Constant et al. 1997, Druihle und Pretolani 1998)

IL-6 stimuliert B-Vorläuferzellen zum Wachstum, es bewirkt in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren die Proliferation von Vorläuferzellen und erweitert die Immunglobulinselektion bei Reifung der B-Zellen. Daneben bewirkt es die Inhibition des Fibroblastenwachstums.

IL-10 inhibiert die Cytokinproduktion von T-Helferzellen (z.B. IFN- γ), stimuliert bereits mit IL-2 oder IL-4 aktivierte T-Zellen, erhöht die Zellzahlen und -aktivität zytotoxischer T-Zellen und beeinflusst die Proliferation der B-Zellen (Fiorentio *et al.* 1989, Vieira *et al.* 1991, de Waal *et al.* 1991, Buelens *et al.* 1995).

IL-13 vermindert nach Isomäki die Produktion proinflammatorischer Cytokine (Isomäki *et al.* 1996).

Zusammenfassend kann man also sagen, dass der Schwerpunkt einer T_H1-Antwort auf zellulären Abwehrmechanismen liegt, wie sie z.B. bei Viren benötigt werden. Z.B. virale Resistenz der Wirtszellen durch IFN- γ vermittelt, Phagozytose zur Antigenpräsentation, ebenfalls durch IFN- γ vermittelt, Proliferation von zytotoxischen T-Lymphozyten (IL-2) vermittelt (Mosmann *et al.* 1989).

Die T_H2-Antwort bewirkt durch IL-10 und IL-4 eine erniedrigte Proliferation der Zellen aus der T_H1-Antwort, sowie über IL-4 und IL-5 den Klassenwechsel in den Isotypen der Plasmazellen, so dass die T_H2-Antwort als humorale (also Antikörper vermittelte) Antwort bezeichnet wird. (Fiorentio *et al.* 1989, Vieira *et al.* 1991, de Waal *et al.* 1991, Buelens *et al.* 1995, Breedveld 1999)

4.5.2 Gibt es eine dominierende T_H Antwort bei Arthrose?

Was bedeutet nun dieses Wissen für das entzündliche Infiltrat der Osteoarthritis? Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass sowohl CD 4+ als auch CD 8+ T-Lymphozyten vorhanden sind. Dies bestätigt die bereits von Kennedy *et al.* 1988 beschriebenen Daten. Als Zytokin für die T_H1-Antwort wurde IL-2 analysiert. Dabei zeigte sich, dass es nur in der Hälfte der untersuchten Fälle eine mässige Ausprägung ergab. IL-10, das als Zytokin für die T_H2-Antwort gewählt wurde, zeigte in der Hälfte aller Fälle zwar nur eine mässige Ausprägung, war aber in absoluten Zahlen stärker vertreten und zeigte schwächere Ausprägung in den IL-2 positiven Fällen. Dies deckt sich zum Teil mit den von Dolganiuc beschriebenen Daten bezüglich der IL-2 und IL-10 Expression, er fand allerdings auch Zellen mit IFN- γ Expression (Dolganiuc *et al.* 1999).

Dies lässt den Schluss zu, dass es sich in der OA in einem Teil der Fälle um eine T_H1-Antwort handelt, dass es aber in der Hälfte der Fälle eine T_H2-Antwort gibt. Betrachtet man das lymphoplasmazelluläre Infiltrat in diesem Kontext, so erscheint es aufgrund der Immunhistochemischen Analyse zur T_H-Antwort zulässig, dass sich um eine T_H2-Antwort handelt. Schliesslich fördert die T_H2-Antwort die Proliferation der

B-Lymphozyten und Plasmazellen sowie die Ausreifung von Antikörpern (Constant et al. 1997).

4.6 Perspektiven

Anhand der vorliegenden Arbeit kann nun folgende Hypothese postuliert werden:

Reife B-Gedächtniszellen, die zu einem anderen Zeitpunkt bereits Kontakt mit den Antigenen der Arthrose hatten, wandern infolge unbekannter Faktoren in die Synovialmembran ein, wandeln sich in einem der T_H2 -Antwort entsprechenden Milieu in vor allem IgG und IgA produzierende Plasmazellen um. Die anwesenden T-Lymphozyten scheinen dabei die noch nötigen immunmodulatorischen Faktoren zur Verfügung zu stellen. Eine dem Keimzentrum entsprechende Maturation der B-Lymphozyten in der Synovialmembran, wie sie bei der RA beschrieben ist (Camacho et al. 1998), findet nur in seltensten Fällen statt.

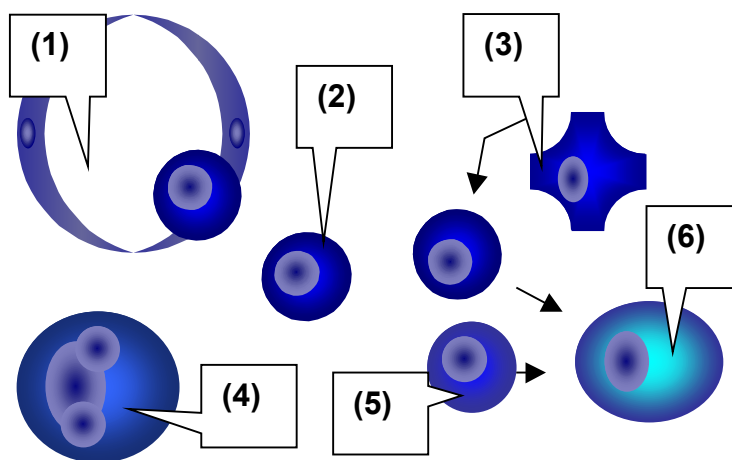


Abbildung 4-3:

Hypothetische Darstellung der Einwanderung eines Antigen aktivierten B-Lymphozyten in die Synovialmembran und die Reifung desselben unter Einfluss der vorhanden Entzündungszellen.

(1)=Kapillare, (2) = B-Zelle, (3)= FDC, (4) = Makrophage, (5) = T-Lymphozyten, (6) = Plasmazelle

Neuere Untersuchungen bestätigen diese Hypothese. Dabei wurden immunhistochemisch anhand von CD 20-CD 27 Doppelfärbungen B-Gedächtniszellen perivaskulär in der Synovialmembran nachgewiesen. Des Weiteren wurde anhand molekularbiologischer Untersuchungen der entsprechenden B-Lymphozyten und Plasmazellen gezeigt, dass diese über hohe Mutationsraten in den IgVH Regionen verfügen, was für eine bereits stattgehabte immunologische Auseinandersetzung der Maturation der Zellen spricht (Souto-Carneiro *et al.* 1999, Krenn *et al.* 1999b).

Ein möglicher Ansatz für die Frage wann die Reifung der B-Zellen stattfand, ist vielleicht im Rahmen der fetalen Ossifikation zu sehen, wo die Knorpelresorption eine Kontaktmöglichkeit darstellt.

Ein Hinweis auf den Grund des geringen Ausprägungsgrades mag die prädominante IL-10 Expression sein, der ein knorpelprotektiver Effekt nachgesagt wird (van den Berg 1999, Finkelman *et al.* 2001).

Dies könnte daher den schwach inflammatorischen Charakter dieser „degenerativen Gelenkerkrankung“ erklären.

5. Zusammenfassung

Die Entzündungsreaktion der Arthrose wird als eine sekundäre Reaktion auf einen degenerativen Prozeß des Gelenkknorpels angesehen. Die Ursache für die Degeneration kann im Mißverhältnis zwischen Belastbarkeit und Beanspruchung liegen, es können metabolische Störungen (Urämie, Diabetes mellitus) verantwortlich gemacht werden, weswegen von sekundärer Arthrose gesprochen wird. Die Ursache der primären Arthrose bleibt unbekannt. Es kann als bewiesen angesehen werden der Zusammenhang mit Alter und Geschlecht der Patienten, denn Arthrose ist in der Regel eine Erkrankung jenseits des fünfzigsten Lebensjahres und betrifft vornehmlich Frauen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Synovialis von 20 Patienten aufgearbeitet und hinsichtlich des enthaltenen entzündlichen Infiltrates untersucht. Unter Anwendung der indirekten Immunperoxidase Technik und der indirekten Immunfluoreszenz Technik wurde die Expression der Antigene CD 20, CD 23, CD 40, CD 27, IgG, IgA, IgM, Kappa, Lambda, CD 3, CD 4, CD 8, Ki-M4, CD 68, Ki-67 sowie die Expression der Cytokine IL-2 und IL-10 analysiert.

Die Synovialmembran zeigte histologisch eine Verbreiterung der Deckzellschicht, Knorpelfragmente innerhalb der Synovialmembran und ein insgesamt schwach ausgeprägtes entzündliches Infiltrat. In lediglich drei von 20 Fällen fand sich eine stärkere entzündliche Infiltration. Diese entzündlichen Infiltrate wiesen eine perivaskuläre Verteilung auf. Am häufigsten wurden in gefäßnahen Regionen B-Lymphozyten identifiziert, Plasmazellen wiesen in der Regel einen deutlich größeren Abstand zum Gefäß auf. Unter den nachgewiesenen Plasmazellen fand sich eine prädominante Expression an IgG bei ausgewogener Anwesenheit sowohl der Kappa- als auch der Lambda- Leichtketten. T-Lymphozyten waren ebenfalls zirkulär um die Gefäße anzutreffen und zeigten eine prädominante Interleukin 10 Expression. Lymphozytäre Aggregate, mit follikelähnlicher Struktur ließen sich in lediglich in 4 von 20 Fällen nachweisen. Makrophagen waren sowohl perivaskulär als auch in der Deckzellschicht nachweisbar. Ki-M4 positive Retikulumzellen (FDC) waren dagegen nur in *einem* von 20 Fällen nachweisbar. Alle Zellpopulationen der Membrana synovialis wiesen nur eine schwache Proliferationsaktivität auf.

Das Fehlen von dem Keimzentrum des Lymphfollikels vergleichbaren Strukturen, die deutliche Abwesenheit von Ki-M4 positiver FDC's sowie die schwache Expression von Ki-67, sprechen trotz Anwesenheit der ebenfalls zur Antigenpräsentation befähigten Makrophagen gegen eine Einwanderung und Maturation nativer B-Lymphozyten in die Membrana Synovialis. Wandern dagegen Gedächtniszellen in die Membrana synovialis ein, so ist eine Maturation mit Follikelbildung nicht mehr notwendig. Unter der Mithilfe von T-Lymphozyten und Makrophagen können die B-Lymphozyten zu Plasmazellen differenzieren.

T-Lymphozyten zeichnen sich ebenfalls durch eine starke perivaskuläre Verteilung aus. Dabei ist die Expression von IL-10 prädominant, was sich als eine Immunantwort von T_H2-Typus interpretieren läßt. Diese ermöglicht eine Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen.

Reife B-Lymphozyten, die unter dem Einfluß einer T_H2 Subpopulation von CD 4 positiven T-Lymphozyten ohne Keimzentrum zu Plasmazellen differenzieren, könnten ein Grund dafür sein, daß follikuläre Strukturen fehlen. Vorgereifte B-Lymphozyten benötigen auch keine inflammatorisch hochpotenten Zytokine um eine schnelle Reifung und eine Immunantwort zu ermöglichen. Dies könnte ein Grund sein, warum die entzündliche Reaktion bei Arthrose so schwach ausgeprägt ist.

Schlagworte (deutsch):

Arthrose, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen, follikulär-dendritischen Zellen , Cytokin , Interleukin, CD20, CD4, FDC, Ki-M4, Ki-67, IL-2, IL-10

6. Summary

Inflammation in osteoarthritis is a secondary reaction to a degenerating process of the articular cartilage. Cause of Degeneration can be a disproportion of mechanical stress and resistance or metabolic diseases like diabetes mellitus. This kind of osteoarthritis is called “secondary osteoarthritis”. Primary osteoarthritis has an unknown cause. Age and sex of the patient are a predictor for osteoarthritis, hence it is a disease of people above the age of 50 and more often it is found in women than in men.

This paper investigated the synovial membranes of twenty patients to characterize the inflammatory Infiltrate. It characterized the cell surface antigen CD 20, CD 23, CD 40, CD 27, CD 3, CD 4, CD 8, Ki-M4, CD 68, the antibodies IgG, IgA, IgM, Kappa, Lambda, the proliferating antigen Ki-67 and the expression profile of the cytokines IL-2 and IL-10 by using immunohistochemical staining (indirect immunoperoxidase technique and indirect immunofluorescence technique) with monoclonal antibodies.

The synovial membrane shows in histology a dissemination of cover cells, fragments of cartilage and a slight expression of inflammatory infiltrate with a perivascular allocation. In only three of twenty cases we detected stronger inflammatory infiltrates. Most of the perivascular cells express CD 20. They are B-lymphocytes. Plasma cells have more distance to the blood vessels and showed a predominant expression of IgG. T-lymphocytes were also detected perivascular. The expression of IL-10 was predominant. Lymphocytes aggregates like lymph follicle were detected in four of twenty cases. Macrophages were proved perivascular as well as in the cover cells. Ki-M4 positive reticulum cells were found *in only one* of twenty cases. All kind of cells in the synovial membrane showed a low proliferation activity.

The absence of germinal centers or comparable structures, the low expression of Ki-M4 and Ki-67 speak against the immigration and maturation of native B-lymphocytes in the synovial membrane. Memory B-lymphocytes don't need germinal centers or compatible structures for maturation, they can mature to plasma cells by help of T-lymphocytes, macrophages or other B-lymphocytes. It is more probably that the detected B-lymphocytes are memory cells.

The perivascular T-lymphocytes in combination with the predominant expression of IL-10 may be interpreted as a T_H2 immune reaction. This supports the maturation of B-lymphocytes to plasma cells.

The maturation of memory B-lymphocytes under influence of T_H2 immune reaction can be the reason for the missing of germinal centers or comparable structures. Matured B-lymphocytes don't need high-grade inflammatory cytokines for quick immune response. This is the possible reason for the low-grade inflammatory reaction of osteoarthritis.

keywords:

osteoarthritis, B-lymphocyte, T-lymphocyte, macrophages, plasma cells, reticular cells, cytokine, interleukins, CD20, CD4, FDC, Ki-M4, Ki-67, IL-2, IL-10

7. Abbildungen

Ziel Zellen / Antigene sind mit Pfeilen markiert.

Abbildungsnr.:	Präparatenummer	Antigen / Färbung	Vergrößerung	Seite
Abbildung 6.1:	Präparat Nr. 22830	Giemsafärbung	200 x Vergrößerung	48
Abbildung 6.2:	Präparat Nr. 22830	IgG (iIP)	100 x Vergrößerung	48
Abbildung 6.3:	Präparat Nr. 22830	IgG (iFT)	1000 x Vergrößerung	48
Abbildung 6.4:	Präparat Nr. 22830	IgA (iFT)	400 x Vergrößerung	48
Abbildung 6.5:	Präparat Nr. 207	CD 20 (iIP)	400 x Vergrößerung	49
Abbildung 6.6:	Präparat Nr. 22830	CD 68 (iIP)	400 x Vergrößerung	49
Abbildung 6.7:	Präparat Nr. 207	Ki-M4 (iIP)	400 x Vergrößerung	49
Abbildung 6.8:	Präparat Nr. 207	Ki-67 (iIP)	200 x Vergrößerung	49
Abbildung 6.9:	Präparat Nr. 234	CD 4(iIP)	400 x Vergrößerung	50
Abbildung 6.10:	Präparat Nr. 234	CD 8 (iIP)	400 x Vergrößerung	50
Abbildung 6.11:	Präparat Nr. 242	IL-2 (iIP)	400 x Vergrößerung	50
Abbildung 6.12:	Präparat Nr. 237	IL-10 (iIP)	400 x Vergrößerung	50

Plasmazellen (Pfeile) in der Übersichtsfärbung (Giemsa), indirekte Immunperoxidasefärbung (iIP) und indirekte Immunfluoreszenz (iFT). **B-Lymphozyten** (CD 20)

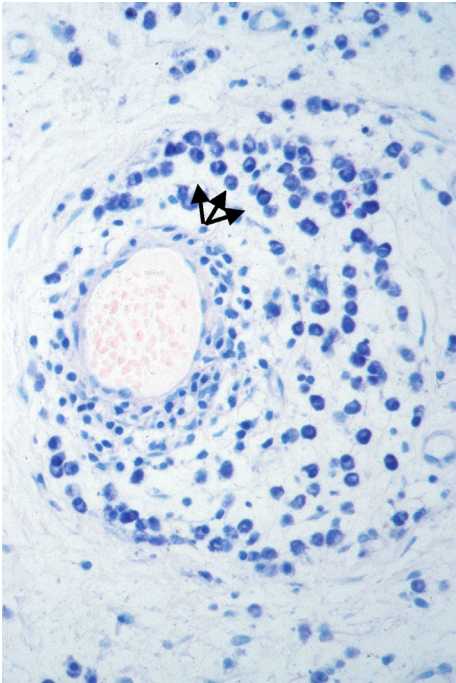


Abbildung 7-1: Giemsa
200-fache Vergrößerung

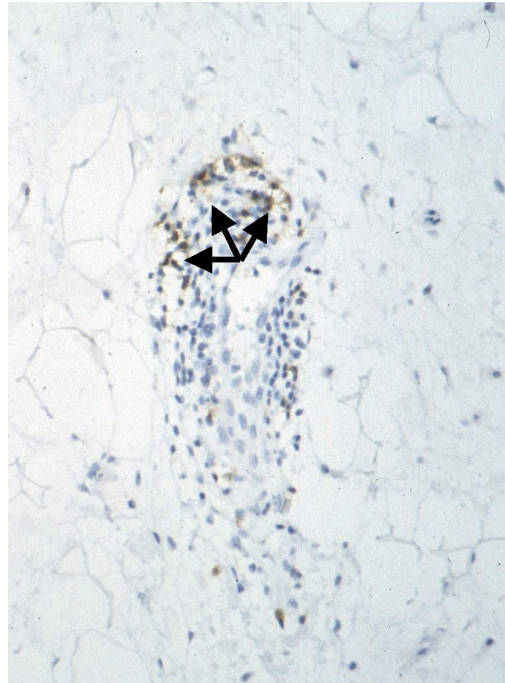


Abbildung 7-2: IgG (iIP)
100-fache Vergrößerung

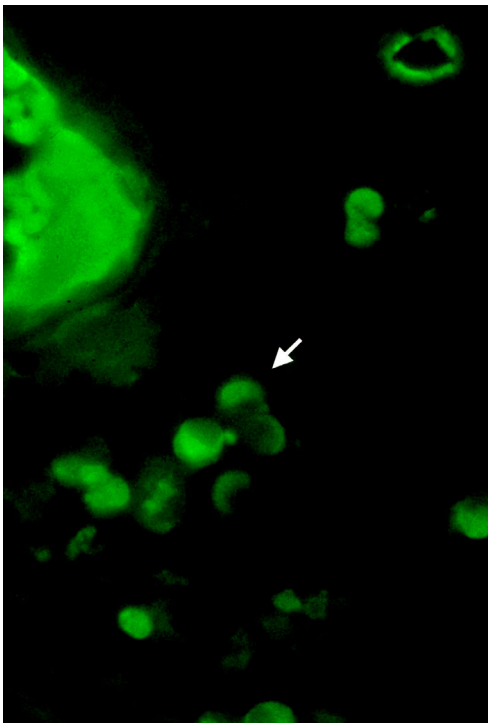


Abbildung 7-3: IgG (iFT)
1000-fache Vergrößerung

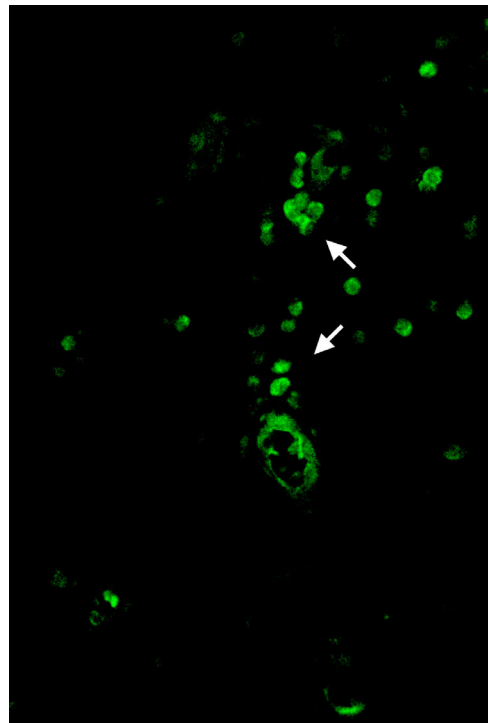


Abbildung 7-4: IgA (iFT)
400-fache Vergrößerung

Makrophagen (CD 68), FDC's (Ki-M4), Expression des Proliferationsantigen Ki-67, indirekte Immunperoxidasefärbung siehe Pfeile

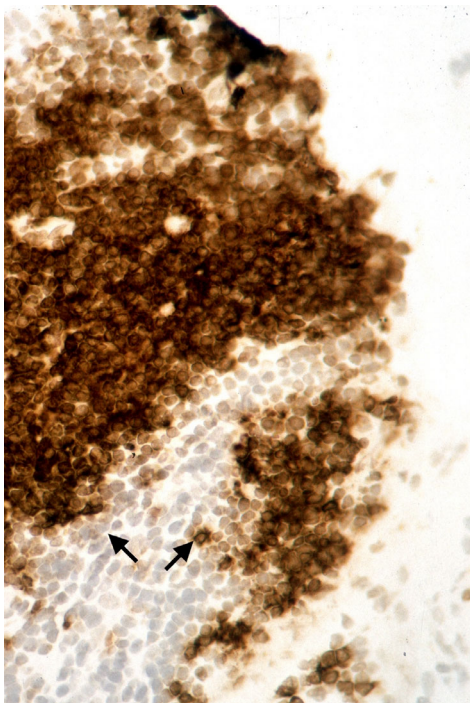


Abbildung 7-5: CD 20 (iIP)
400-fache Vergrößerung

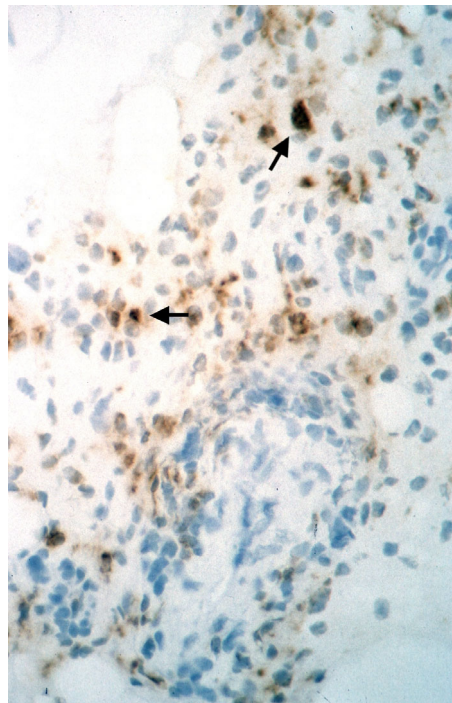


Abbildung 7-6: CD 68 (iIP)
400-fache Vergrößerung

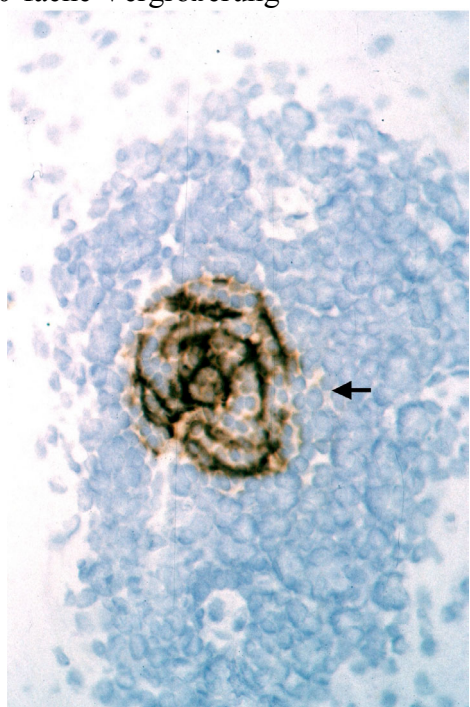


Abbildung 7-7: Ki-M4 (iIP)
400-fache Vergrößerung

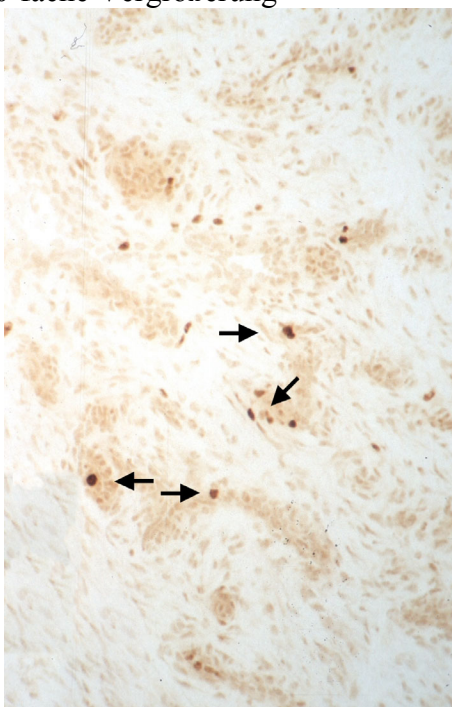


Abbildung 7-8: Ki-67 (iIP)
200-fache Vergrößerung

T-Lymphozyten (CD 4, CD 8) und Interleukine (IL-2, IL-10) siehe Pfeile

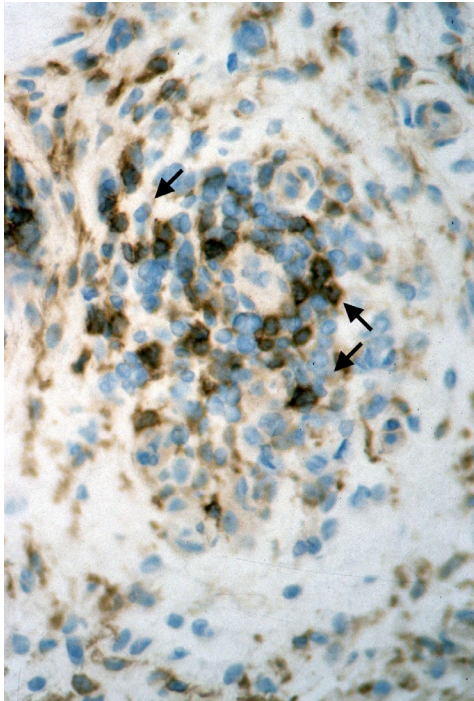


Abbildung 7-9: CD 4 (iIP)
400-fache Vergrößerung

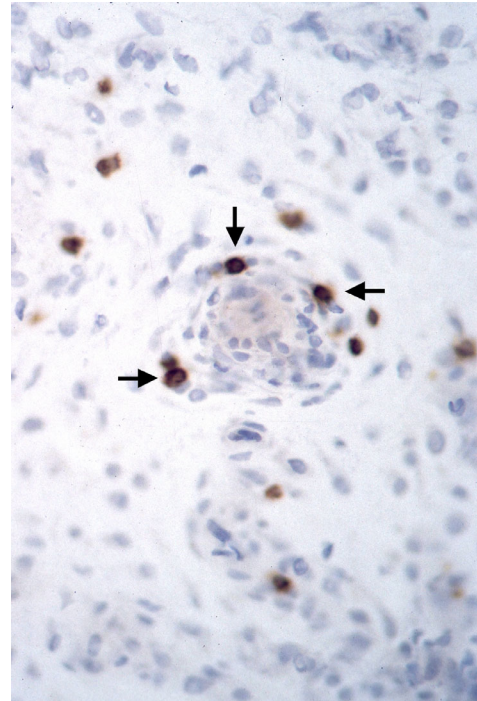


Abbildung 7-10: CD 8 (iIP)
400-fache Vergrößerung

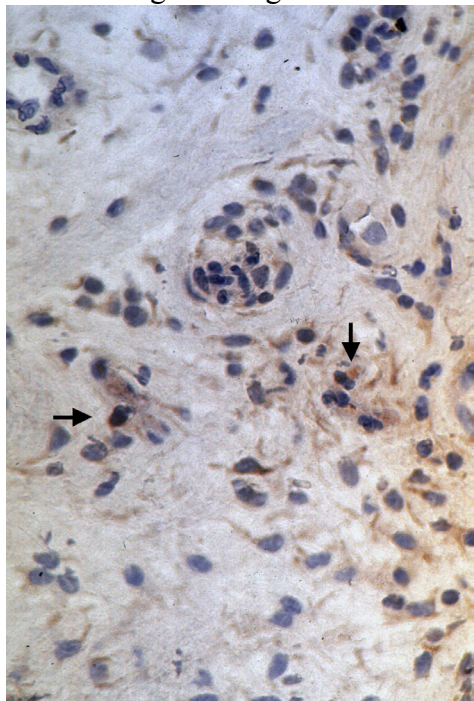


Abbildung 7-11: IL-2 (iIP)
400-fache Vergrößerung

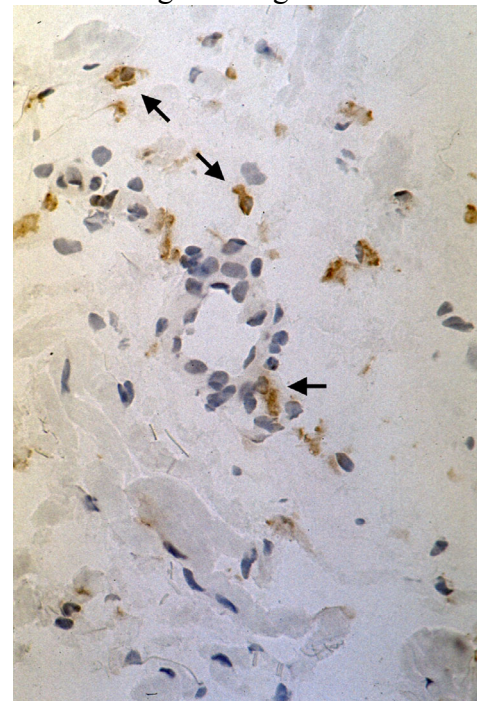


Abbildung 7-12: IL-10 (iIP)
400-fache Vergrößerung

8. Literatur

1. Aigner *et al.* 1995
Aigner T, Dietz U, Stoss H, von der Mark K: Differential expression of collagen types I, II, III, and X in human osteophytes. *Lab Invest* 1995 Aug; 73(2):236-43
2. Aigner et al. 2001
Aigner T, Zien A, Gehrsitz A, Gebhard PM, McKenna L.: Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis Rheum* 2001 Dec; 44 (12):2777-89
3. Aigner et al. 2002
Aigner T, McKenna L.: Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2002 Jan;59(1):5-18
4. Altman 1991
Altman RD: Classification of disease: Osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum (Suppl2)* 1991; 20: 40-47
5. Altman 1995
Altman RD: The classification of osteoarthritis. *J Rheumatol* 1995; 22:42-3
6. Altman *et al.* 1990
Altman A, Coggeshall KM and Mustelim T: Molecular events mediating T cell activation. *Adv Immunol* 1990 48,227
7. Athanasou *et al.* 1995
Athanasou NA: Synovial macrophages. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:392-394.
8. Barland 1962
Barland P, Novikoff AB, Hamerman D: Electron microscopy of the human synovial membrane. *J Cell Biol* 1962; 14:207-216.

9. Berek *et al.* 1985

Berek C, Griffriths GM, Milstein C.: Molecular events during maturation of the immune response to oxazolone. *Nature* 1985 Aug 16(6027):412-8

10. Berek 1992

Berek C.: The development of B cells and the B-cell repertoire in the microenvironment of the germinal center. *Immunol Rev* 1992 Apr;126:5-19

11. Berek *et al.* 1997

Berek C, Kim HJ: B-cell activation and development within chronically inflamed synovium in rheumatoid and reactive arthritis. *Semin Immunol* 1997 Aug; 9(4):261-8

12. Birk *et al.* 2001

Birk RW, Gratchev A, Hakiy N, Politz O, Schledzewski K, Guillot P, Orfanos CE, Goerdts S.: Alternative activation of antigen-presenting cells: concepts and clinical relevance. *Hautarzt* 2001 Mar; 52(3):193-200

13. Blanco *et al.* 1999

Blanco FJ, Guitián R, Varcía-Porrúa et al.: Osteoarthritis (OA) chondrocytes death by apoptosis: A possible pathway for OA pathologie. *Arthritis Rheum* 1999; 39(suppl): S269

14. Breedveld 1999

Breedveld FC: Future trends in the treatment of rheumatoid arthritis: cytokine targets. *Rheumatol.* 1999; 38(suppl.2):11-13

15. Buelens *et al.* 1995

Buelens C, Willems F, Delvaux A et al.: Interleukin 10 differentially regulates B7 (CD 80) and B7(CD 68) expressions on human peripheral blood dendritic cells. *Eur J Immunol* 1995; 29, 2668

16. Camacho *et al.* 1998
Camacho SA, Kosco-Vilbois MH, Berek C: The dynamic structure of human germinal centre. *Immunol Today* 1998; 19:511-514
17. Constant *et al.* 1997
Constant SL, Bottomly K.: Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:297-322
18. Cooke 1985
Cooke TDV: Pathogenetic mechanisms in polyarticular osteoarthritis. *Clin Rheum Dis* 1985; 11: 203-238
19. Cooper *et al.* 1981
Cooper NS, Soren A, McEwen C, Rosenberger JL: Diagnostic specificity of synovial lesions. *Hum Pathol* 1981; 12:314-28
20. de Waal *et al.* 1991
De Waal MR, Abrams J, Bennet B, Figdor CG and EDV-J: Interleukin 10, (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes and autoregulatory role of IL10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174,1209
21. Dolganiuc *et al.* 1999
Dolganiuc A, Stavaru C, Anghel M, Georgescu E, Chichos B, Olinescu A.: Shift toward T lymphocytes with Th1 and Tc1 cytokine-secterion profile in the joints of patients with osteoarthritis. *Roum Arch Microbiol Immunol* 1999 Jul-Dec;58(3-4):249-58
22. Druihle und Pretolani 1998
Druihle A, Pretolani M.: Eosinophila and interleukin 5: role in pulmonary atopic process. *Med Trop* 1998; 58 (4): 437-43
23. Fassbender 1987
Fassbender HG: Role of chondrocytes in the development of osteoarthritis. *Am J Med* 1987 Nov 20; 83(5A):17-24

24. Felsen *et al.* 1994

Felson DT, Radin EL: What causes knee osteoarthritis: are different compartments susceptible to different risk factors? *J Rheumatol* 1994; 21:81-183

25. Finkelman *et al.* 2001

Finkelman FD, Urban JF Jr: The other side of the coin: the protective role of the TH2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001 *May*; 107(5):772-80

26. Fiorentio *et al.* 1989

Fiorentio DF, Bond MW, Mosmann TR: Two types of mouse helper cell clones Iv. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J Exp Med* 1989 170,2081

27. Fritz *et al.* 1981

Fritz P, Muller J, Wegner G, Laschner W, Braun U: Distribution of immunoglobulin classes in joint capsules in osteoarthritis (arthrosis) and chronic polyarthritis. *Z Rheumatol* 1981; 40:187-194

28. Gerdes *et al.* 1983

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983 Jan 15; 31(1):13-20

29. Goldenberg *et al.* 1982

Goldenberg DL, Egan MS, Cohen AS : Inflammatory synovitis in degenerative joint disease. *J Rheumatol* 1982 *Mar-Apr*; 9(2):204-9

30. Hoaglund & Steinbach 2001

Hoaglund FT, Steinbach LS: Primary osteoarthritis of the hip: etiology and epidemiology. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9 (5): 320-7

31. Holderbaum *et al.* 1999

Holderbaum D, Haqqi TM, Moskowitz RW: Genetics and osteoarthritis: exposing the iceberg. *Arthritis Rheum* 1999; 42:397-405.

32. Isomäki *et al.* 1996

Isomäki P, Luukkainen R, Toivanen P, Punnonen J: The presence of interleukin-13 in rheumatoid synovium and its antiinflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996 Oct; 39(10):1693-702

33. Johnson *et al.* 1986

Johnson GD, Hardie DL, Ling NR, MacLennan IC: Human follicular dendritic cells (FDC): a study with monoclonal antibodies (MoAb). *Clin Exp Immunol* 1986 Apr; 64(1):205-13

34. Kennedy *et al.* 1988

Kennedy TD, Plater-Zyberk C, Partridge TA, Woodrow DF, Maini RN: Morphometric comparison of synovium from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Clin Pathol* 1988 Aug; 41(8):847-52

35. Krenn *et al.* 1990

Krenn V, Hoffmann S, Engel A: First description of mechanoreceptors in the corpus adiposum infrapatellare of men. *Acta Anat* 1990; 137:187-189.

36. Krenn *et al.* 1996

Krenn V, Schalhorn N, Greiner A, Molitoris R, König A, Gohlke F, Müller-Hermelink HK: Immunohistochemical analysis of proliferating and antigen-presenting cells in rheumatoid synovial tissue. *Rheumatol Int* 1996; 15(6):239-47

37. Krenn *et al.* 1999a

Krenn V, König A, Hensel F., Berek C, Souto Carneiro MM, Haedicke W, Wang YK, Vollmers HP, Müller-Hermelink HK: Molecular analysis of RF-negative B-cell hybridomas from rheumatoid synovial tissue: Evidence for an antigen-induced stimulation with selection of high mutated IgVH and low mutated IgVL/ λ genes. Clin Exp Immunol 1999; 115:168-175.

38. Krenn *et al.* 1999b

Krenn V, Hensel F, Kim HJ, Souto Carneiro MM, Starostik P, Ristow G, König A, Vollmers HP, Müller-Hermelink HK: Molecular IgV(H) analysis demonstrates highly somatic mutated B cells in synovialitis of osteoarthritis: a degenerative disease is associated with a specific, not locally generated immune response. Lab Invest 1999 Nov; 79(11):1377-84

39. Kriegsmann *et al.* 1995

Kriegsmann J, Keyszer G, Geiler T, Brauer R, Gay R, Gay S: Expression of vascular cell adhesion molecule mRNA and protein in rheumatoid synovium demonstrated by in situ hybridisation and immunohistochemistry. Lab Invest 1995; 72: 209-214.

40. MacLennan 1994

MacLennan IC: Germinal Centers. Annu Rev Immunol 1994 12:117-139

41. Martel-Pelletier 1999

Martel-Pelletier J: Pathophysiology of osteoarthritis Osteoarthritis Cartilage 1999 Jul; 7(4): 371-3

42. Mellman *et al.* 2001

Mellman I, Steinman RM.: Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell 2001 Aug 10; 106(3):255-8

43. Mohr 1993
Mohr W: Pathogenese der Arthrose - primäre Ereignisse und Folgen. Med Orthop Tech 1993; 113:54-58
44. Mohr 2000a
Mohr W : Gelenkpathologie Springer 2000; 68-86
45. Mohr 2000b
Mohr W: Gelenkpathologie Springer 2000; 418-439
46. Mohr *et al.* 1986
Mohr W: Pathomorphologic aspects of the conservative therapy of arthroses. Orthopade 1986 Sep; 15(5):366-78
47. Moos *et al.* 2001
Moos V, Sieper J, Herzog V, Müller B: Regulation of Expression of Cytokines and Growth Factors in Osteoarthritic Cartilage Explants. Clin Rheumatol 2001 20:353-358
48. Mosmann *et al.* 1986
Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two Types of murine helper T-cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986 Apr 1; 136 7:2348-57
49. Mosmann *et al.* 1989
Mosmann TR, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann Rev Immunol 1989; 7:145-173
50. Mueller *et al.* 1989
Mueller DL, Jenkins MK, Schwarz RH: Clonal expansion versus clonal inactivation a costimulatory signaling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. Ann Rev Immunol 1989; 7, 445

51. Petrasch *et al.* 1990

Petrasch S, Perez-Alvarez C, Schmitz J, Kosco M, Brittinger G.: Antigenic phenotyping of human follicular dendritic cells isolated from nonmalignant and malignant lymphatic tissue. *Eur J Immunol* 1990 *May*; 20(5):1013-8

52. Radin *et al.* 1991

Radin EL, Burr DB, Caterson B, Fyhrie D, Brown TD, Boyd RD: Mechanical determinants of osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 1991 *Dec*; 21 (3 *Suppl* 2):12-21

53. Remmele 1997

Remmele W: Pathologie. Springer 1997; Band 5: 444-454

54. Reparón-Schuijt *et al.* 2001

Reparón-Schuijt CC, van Esch WJ, van Kooten C, Ezendam NP, Levarht EW, Breedveld FC, Verweij CL.: Presence of a population of CD20+, CD38- B lymphocytes with defective proliferative responsiveness in the synovial compartment of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001 *Sep*; 44(9): 2029-37

55. Revell *et al.* 1988

Revell PA, Mayston V, Lalor P, Mapp P: The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Ann Rheum Dis* 1988 *Apr*; 47(4):300-7

56. Rhaney & Lamb 1955

Rhaney K, Lamb DW: The cysts of osteoarthritis of the hip. *J. Bone Joint Surg* 1955; 37: 511-515

57. Ristow *et al.* 1999

Ristow G, Krenn V, Souto Carneiro MM, König A, Kramer C, Müller-Hermelink HK: Immunophenotype of the inflammatory infiltrate and expression of interleukin 2 and interleukin 10 in osteoarthrotic synovial tissue. *Pathol. Res Pract* 1999; 195:317

58. Sakkas *et al.* 1998

Sakkas LI et al.: Interleukin 2 (IL-2) transcripts were found in 10 of 18 patients, Gamma interferon (IFN-gamma) transcripts were detected in 9 of 18 patients with OA, whereas IL-10 transcripts were found in nearly all patients *Clin Diagn Lab Immunol* 1998 Jul ;5(4):430-7

59. Seder *et al.* 1994

Seder RA and Paul WE: Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD 4+ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1994, 12 635-673

60. Shaun *et al.* 2000

Shaun R, Edward DH, Clement BS: Kelley's Textbook of Rheumatology. W.B. Saunders Company 2000

61. Soren *et al.* 1988

Soren A, Cooper NS, Waugh TR: The nature and designation of osteoarthritis determined by ist histopathology. *Clin Exp Rheumatol* 1988; 6: 41-46

62. Souto-Carneiro *et al.* 1999

Souto-Carneiro MM, Krenn V, Hermann R, Ristow G, Konig A, Muller-Hermelink HK: Mutational pattern of Ig-VH genes of synovial B-lymphocytes from different anatomical locations in a rheumatoid arthritis patient. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1999; 83:260-9

63. Springer 1990

Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Native Lond* 1990 346, 425

64. Stiehl 1997

Stiehl P (1997): Histologie der Rheumatoid-Arthritis. Beitrag zur diagnostischen und pathogenetischen Heterogenität, zur Aktivitätsdiagnose und Prognose. In U. Sack (Hrsg) Update: Clin Immunol 5:188-200

65. Sulzbacher 2000

Sulzbacher I: Arthrosis - histology and pathogenetic approaches. Radiologe 2000; 40 (12): 1126-33

66. Sun *et al.* 1997

Sun Y, Sturmer T, Gunther KP, Brenner H: Incidence and prevalence of cox- and gonarthrosis in the general population]. Z Orthop Ihre Grenzgeb 1997 *May-Jun*; 135(3):184-92

67. Trinchieri *et al.* 1996

Trinchieri G, Perrit D, Gerosa F: Acute induction and priming for cytokine production in lymphocytes Cytokine Growth Factor Rev. 1996 *Aug*; 7(2):123-32

68. van den Berg 1999

Van den Berg WB: The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Z Rheumatol 1999 *Jun*; 58(3):136-41

69. van den Berg 2001

Van den Berg WB: Lessons from animal models of osteoarthritis. Curr Opin Rheumatol 2001 *Sep*; 13(5):452-6

70. van Seventer *et al.* 1991

Van Seventer GA, Shimizu Y, Shaw S: Roles of multiple accessory molecules in T cell activation. Curr Opin Immunol 1991; 3, 294

71. Vieira *et al.* 1991

Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, deVries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR, Moore KW: Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Feb 15; 88(4):1172-6

72. Vingård *et al.* 1991

Vingård E, Alfredsson L, Goldie I, Hogstedt C: Occupation and osteoarthritis of the hip and knee: A register-based cohort study. *Int J Epidemiol* 1991; 20:1025-1031.

73. Wedge *et al.* 1991

Wedge JH, Wasylenko MJ, Houston CS: Minor anatomic abnormalities of the hip joint persisting from childhood and their possible relationship to idiopathic osteoarthritis. *Clin Orthop* 1991; 264: 122-128

74. Wong *et al.* 2001

Wong CK, Ho CY, Ko FW, Chan CH, Ho AS, Hui DS, Lam CW: Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and TH cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol* 2001 Aug; 125(2):177-83

75. Yamamoto *et al.* 1996

Yamamoto M, Vancott JL, Okahashi N, Marinaro M, Kiyono H, Fujihashi K, Jackson RJ, Chatfield SN, Bluethmann H, McGhee JR: The role of TH1 and TH2 cells for mucosal IgA response. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 778: 64-71

76. Zimny 1988

Zimny ML : Mechanoreceptors in articular tissues *Am J Anat* 1998; 182:16-32.

77. Zwillich *et al.* 1994

Zwillich SH, Fang Q, Kieber-Emmons T, Vonfeldt J, Monos D, Ramanujam T, Wang B, Weiner DB, Willams WV: V alpha gene usage in rheumatoid compared with osteoarthritic synovial tissue T cells. *DNA Cell Biol* 1994; 13:923-931

9. Anhang

Tabellenübersicht

Tabelle 2.1 Patienten und Gewebe	14
Tabelle 2.2 Liste der monoklonalen Antikörper.....	15
Tabelle 3.1 B-Zell Antigene	21
Tabelle 3.2 Plasmazell Antigene	22
Tabelle 3.3 Antigene der antigenpräsentierenden Zellen	23
Tabelle 3.4 Verteilungsmuster T-Lymphozyten.....	24
Tabelle 3.5 Gegenüberstellung der CD 4 / IL-2 Expression	25
Tabelle 3.6 Gegenüberstellung der CD 4 / IL-10 Expression	26
Tabelle 3.7 Gegenüberstellung von IL-2 und IL-10	27

Abbildungsübersicht

Abbildung 4-1:	34
Abbildung 4-2:.....	37
Abbildung 4-3:.....	40
Abbildung 6-1: Giemsa 200-fache Vergrößerung	48
Abbildung 6-2: IgG (iIP) 100-fache Vergrößerung.....	48
Abbildung 6-3: IgG (iFT) 1000-fache Vergrößerung.....	48
Abbildung 6-4: IgA (iFT) 400-fache Vergrößerung.....	48
Abbildung 6-5: CD 20 (iIP) 400-fache Vergrößerung.....	49
Abbildung 6-6: CD 68 (iIP) 400-fache Vergrößerung.....	49
Abbildung 6-7: Ki-M4 (iIP) 400-fache Vergrößerung	49
Abbildung 6-8: Ki-67 (iIP) 200-fache Vergrößerung.....	49
Abbildung 6-9: CD 4 (iIP) 400-fache Vergrößerung.....	50
Abbildung 6-10: CD 8 (iIP) 400-fache Vergrößerung.....	50
Abbildung 6-11: IL-2 (iIP)	50
Abbildung 6-12: IL-10 (iIP)	50

Danksagung

Ich möchte Hr. Prof. Dr. V. Krenn für seine umfangreiche Unterstützung danken und insbesondere für seine Geduld und Überzeugung in diese Arbeit.

Bei Fr. Dr. rer. nat. Dipl. Biochem. M. Souto-Carneiro und Hr. Dr. rer. nat. Dipl. Biol. R. Hermann möchte ich mich für wichtige Diskussionen und moralische Unterstützung bedanken.

Stellvertretend für alle MTAs, die mich in den Methoden unterwiesen und mich bei dieser Arbeit unterstützten möchte ich Fr. C. Kohaut danken.

Abschließend gilt mein Dank meiner Lebensgefährtin Fr. N. Büßelberg, für Geduld, Verständnis und allgemeine Unterstützung sowie meinen Eltern, die mir eine gute Studienzeit in Würzburg ermöglicht hatten.

Curriculum vitae

Persönliche Daten	Gerhard Ristow
	06.05.1971 in Gießen
	deutsche Staatsangehörigkeit
Schulbildung	1977 - 1981 St. Medardus Grundschule Bendorf
	1981 - 1991 Wilhelm Remy Gymnasium Bendorf
Berufsausbildung	11/1991 bis Staatl. Berufsfachschule für technische Assistenten 10/1993 in der Medizin, an der Universität Würzburg
Studium	04/1994 bis Universität Würzburg: Studiengang Human- 11/2000 medizin
Approbation	1.09.2002 Approbation
Berufspraxis	12/1993 bis MTA am Institut für Hygiene und Mikrobiologie 04/1994 der Julius - Maximilians - Universität, Würzburg
	03/2001 bis Arzt im Praktikum am Zentralinstitut für Seelische 08/2002 Gesundheit, in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes und Jugendalters
	Seit 09/2002 Stationsarzt am Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes und Jugendalters
Lehrtätigkeiten	09/2001 bis Lehrauftrag für Kinder- und Jugendpsychiatrie an 09/2002 der Schule für Logopädie der Gesellschaft für Gesundheitsbildung und -förderung in Karlsruhe

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 07. April 2003

Gerhard Ristow